



Seleção de plantas com efeito alelopático para controlar *Phytophthora cinnamomi*

Ana Rita Brito Chedas de Sampaio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica - Protecção de Plantas

Orientadoras: Doutora Ana Cristina Pires Moreira de Sousa Marcelino
Professora Doutora Maria Helena Oliveira

Júri:

Presidente: Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora
Associada com agregação do Instituto Superior de Agronomia da
Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar com Agregação do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa
Doutora Ana Cristina Pires Moreira de Sousa Marcelino, Investigadora
Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar o seu sonho em realidade”, Walt Disney

Este trabalho foi escrito com a ortografia utilizada antes da implementação do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores: à Doutora Ana Cristina Moreira, à Doutora Isabel Calha e ao Doutor José António Passarinho pela orientação preciosa, pelo conhecimento passado, pela amizade e por me terem acolhido tão bem no INIAV. Agradeço ter tido a bênção de ter estes três fantásticos orientadores que nunca desistiram de mim.

Desejaria também agradecer às assistentes técnicas Isabel Lourenço e Júlia Cadete. À Isabel pelo seu auxílio na preparação de meios e de material que muito contribuiu para o meu trabalho. À Júlia, que muito me ajudou nas sementeiras, lavagens de raízes e nos levantamentos de ensaios na estufa.

Agradeço também ao Engenheiro Luis Fernandes pela ajuda na análise estatística.

Quero agradecer às assistentes técnicas Florinda Medeiros e Marina Soares, pelo bom ambiente criado nos laboratórios, tornando-os num local em que dá gosto trabalhar.

Ainda do INIAV, agradeço ao departamento de Virologia pela cedência do potenciómetro, ao departamento de Fitobacteriologia pela cedência da centrífuga bem como a Laboratório de Solos na pessoa da Doutora Maria Amélia Castelo Branco que tão gentilmente fez as análises de terras.

O meu muito obrigado aos professores do departamento de Patologia Vegetal, por me terem mostrado este mundo fascinante e me terem incentivado a conhecê-lo. Ao Professor Doutor Arlindo Lima, à Professora Doutora Helena Oliveira e à Professora Doutora Ana Paula Ramos. Também deixo uma palavra de apreço e consideração aos professores do departamento de Protecção de Plantas, sem os quais nunca teria escolhido esta especialidade. Por todo o conhecimento transmitido, agradeço ao Professor Doutor António Mexia, à Professora Doutora Elisabete Figueiredo, ao Professor Doutor José Franco e à professora Doutora Maria José Cerejeira.

Agradeço ainda aos professores que marcaram o meu percurso escolar no Instituto Superior de Agronomia, especialmente a Professora Doutora Ana Monteiro que, para além das suas aulas de Herbologia, me apresentou o tema da Alelopatia e que sempre me incentivou a estudá-lo mais e mais.

Às minhas colegas Maria João Camacho, Leidy Mora e Cristino deixo também uma palavra de reconhecimento pelo tempo que me ouviram, pela companhia e amizade ao longo destes cinco anos de caminhada académica.

Para a minha família, não são precisas palavras...

RESUMO

O declínio dos Montados de sobro e azinho é uma doença que tem sido descrita desde a década de 80 do século passado e é influenciada pela interacção de factores bióticos e abióticos. Inúmeros estudos mostram uma associação entre espécies do género *Phytophthora* e o declínio dos Montados, sendo que *Phytophthora cinnamomi* é a espécie isolada com mais frequência nos solos desses ecossistemas.

P. cinnamomi é um patógeno do solo, da classe Oomycota, que causa podridão radicular e, consequentemente, a morte da planta. A sua erradicação dos solos é muito difícil. Os produtos fitofarmacêuticos utilizados até ao momento não apresentam eficácia no seu controlo, pois o patógeno encontra-se disseminado nos solos e apresenta uma elevada gama de hospedeiros. Tais condições favorecem a sua sobrevivência.

Dado que a luta química para o controlo de *P. cinnamomi* tem-se mostrado ineficaz, é necessário procurar alternativas mais sustentáveis.

Este trabalho teve como objectivo apresentar um primeiro contributo para a selecção de plantas com um efeito alelopático sobre *P. cinnamomi*. Para tal, seleccionaram-se doze espécies das seguintes famílias: Fabaceae, Poaceae, Lamiaceae e Brassicaceae. Avaliou-se a susceptibilidade das espécies seleccionadas a *P. cinnamomi* em ensaios em estufa, tendo-se observado que três espécies foram infectadas. Realizaram-se ensaios *in vitro* de modo a testar os extractos aquosos radiculares das plantas e determinar os seus efeitos na actividade do patógeno através do seu crescimento micelial, produção de esporângios e clamidósporos bem como da viabilidade e germinação de zoósporos.

Como resultado, seleccionou-se as espécies *Eruca sativa* e *Raphanus raphanistrum* por inibirem quase totalmente o crescimento e desenvolvimento do patógeno. O efeito inibitório total na actividade do patógeno foi observado no extracto combinado das duas espécies. Por outro lado, os extractos de gramíneas, em particular de *Lolium rigidum*, tiveram um efeito promotor do patógeno.

Palavras-chave: Alelopatia, declínio do montado, *Quercus suber*, *Quercus rotundifolia*

ABSTRACT

The decline of cork oak and holm oak is a disease described since the late 80s of the last century and is influenced by the interaction of biotic and abiotic factors. Many studies have shown an association between species of the genus *Phytophthora* and the declining woodlands ("Montados"). *Phytophthora cinnamomi* is the most frequent pathogen isolated from the soil of these ecosystems.

P. cinnamomi is a soilborne pathogen, from Oomycota class, that causes root rot and, consequently, the death of the plant. Its eradication of the soil is very difficult. The phytopharmaceutical products used so far are not effective in its control because the pathogen is highly dispersed in the soil and shows a large range of hosts. These conditions favor its survival.

As the chemical control of *P. cinnamomi* has been shown to be ineffective, it is necessary to seek more sustainable alternatives.

This study aimed to present a contribution to the selection of plants with allelopathic effect on *P. cinnamomi*. Twelve plant species were selected from the following families: Brassicaceae, Fabaceae, Lamiaceae and Poaceae. The susceptibility of these species to *P. cinnamomi* was evaluated in controlled greenhouse tests, showing that three species were infected by the pathogen.

Bioassays were carried out *in vitro* to test the plants aqueous root extracts and to determine its effects on pathogen activity via mycelial growth, chlamydospores and sporangia's production as well as zoospores's viability and germination.

Thus, it was possible to select species *Eruca sativa* and *Raphanus raphanistrum* as species that inhibit the growth and development of the pathogen, confirming also the inhibitory effect of the two species combined. Moreover, this two species combined had a greater inhibitory effect on *P. cinnamomi*. On the other hand, the extracts of Poaceae, in particular *Lolium rigidum*, had a potentiating effect of the pathogen.

Key-words: Allelopathy, oak decline, *Quercus suber*, *Quercus rotundifolia*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE QUADROS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enquadramento e objectivos do trabalho	1
1.2 O Montado	1
1.2.1 O sobreiro e a azinheira	2
1.2.2 A vegetação do Montado	5
1.3 O declínio do Montado	7
1.3.1 Sintomatologia.....	9
1.4 Biologia e ecologia de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	10
1.5 Medidas de controlo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Obtenção do material biológico	21
2.1.1 Cultivo das espécies de plantas seleccionadas para a obtenção de raízes.....	23
2.2 Preparação dos extractos aquosos radiculares (EARs).....	24
2.3 Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação do efeito de extractos aquosos radiculares (EARs) nas estruturas de <i>Phytophthora cinamomi</i>	24
2.3.1 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) no crescimento micelial.....	24
2.3.2 Efeito dos extractos radiculares aquosos (EARs) na produção de esporângios, formação e libertação de zoósporos.....	25
2.3.3 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na germinação dos zoósporos.....	26
2.3.4 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de clamidósporos.....	27
2.3.5 Cálculo do efeito de inibição dos extractos aquosos radiculares (EARs) no crescimento micelial e nas estruturas do patogénio.....	27
2.4 Testes de patogenicidade	27
2.4.1 Preparação do inóculo.....	27
2.4.2 Estabelecimento dos ensaios de patogenicidade em estufa	29

2.5 Análise estatística dos resultados	31
3. RESULTADOS	32
3.1 Cultivo das espécies seleccionadas para a preparação de extractos aquosos radiculares (EARs)	32
3.2 Avaliação dos extractos aquosos radiculares (EARs)	33
3.3 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) no crescimento micelial	34
3.4 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de esporângios, formação e libertação de zoósporos	37
3.5 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na germinação dos zoósporos.....	41
3.6 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de clamidósporos.....	44
3.6 Testes de patogenicidade	46
4. DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS.....	72
Anexo 1 – Caracterização física do solo	72
Anexo 2 – Meios de cultura	72
2.1 Meio PDA (Potato Dextrose Agar).....	72
2.2 Meio de V8 (modificado de Erwin e Ribeiro, 1996)	72
2.3 Meio PARPH (modificado de Jeffers e Martin, 1986)	72
2.4 Meio de agar-água (0,2%).....	72
Anexo 3 – Suspensão de solo (adaptado de Chee e Newhook, 1965; Tuset <i>et al.</i> , 2001)	73
Anexo 4 – Estados fenológicos (Escala BBCH)	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da área de Montado na zona do Mediterrâneo (APCOR, 2016)	2
Figura 2 – Áreas ocupadas pelas principais espécies florestais em Portugal (dados do 6º INF, 2013)	3
Figura 3 – Mapa de distribuição das principais espécies florestais em Portugal Continental (ICNF, 2013)	4
Figura 4 – Sintomas de declínio em sobreiro (A - <i>dieback</i> e desfoliação; B – exsudados no tronco) (Moreira, 2014; Tuset et al., 1996)	9
Figura 5 – Árvore afectada pela morte súbita (Moreira, 2014)	10
Figura 6 – Clamidósporo (A) e esporângio (B) de <i>Phytophthora cinnamomi</i> produzidos em suspensão de solo não estéril, com incubação a 20°C	11
Figura 7 – Ciclo da doença causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	12
Figura 8 – Gametângios produzidos em cultura dupla a 25 °C em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA). Oogónios esféricos, de parede lisa, com oósporos pleróticos e anterídios anfigínios: A) anterídio bicelular. an - anterídio; B) oos - oósporo.	13
Figura 9 – Formas de libertação de aleloquímicos	17
Figura 10 – Crescimento do isolamento Pc 5833 em meio de V8 líquido, após 8 dias de incubação a 25°C, no escuro	25
Figura 11 – Isolamentos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> utilizados na preparação do inóculo para a infestação artificial do solo, em meio de PDA, ao fim de 12 dias de incubação a 25°C (A- face superior; B- face inferior)	28
Figura 12 – Balões de Erlenmyer com o inóculo	28
Figura 13 – Tabuleiros com millet inoculado e não inoculado com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	29
Figura 14 – Vaso com millet inoculado com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	30
Figura 15 – Germinação dos táxons selecionados para a preparação de extractos aquosos radiculares (EARs)	32
Figura 17 – Actividade dos extractos aquosos radiculares (EARs) de <i>Phlomis purpurea</i> (PLMPU), <i>Raphanus raphanistrum</i> (RAPRA), <i>Eruca sativa</i> (ERUVE), a 75% no crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meio de V8 líquido após 12 dias de incubação a 25°C e micélio desenvolvido no controlo (Cont.)	37
Figura 18 – Actividade do extracto radicular combinado (EARc) de <i>Eruca sativa</i> + <i>Raphanus raphanistrum</i> a 75% no crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meio de V8 líquido após 12 dias de incubação a 25°C (A) e micélio de <i>P.cinnamomi</i> desenvolvido em meio de V8 líquido após 12 dias de incubação a 25°C (Cont.) (B)	37
Figura 19 – Micélio formado em presença dos extractos aquosos radiculares (EARs) de <i>Eruca sativa</i> (ERUVE) e <i>Cicer arietinum</i> ‘Desi’ (CLEAR ‘Desi’) e no controlo	38
Figura 20 – Esporângios (esp.) produzidos em extracto radicular aquoso (EAR) de <i>Lolium rigidum</i> a libertar uma massa de zoósporos indiferenciada (zoo. indf) e zoósporos respectivos (zoo.) em água destilada estéril	42

Figura 21 – Zoósporos germinados (zoo. germ) em presença de extracto de <i>Lolium rigidum</i> (C2-75%) e em meio de V8 sólido (25%) após 24 horas de incubação a 25°C, no escuro	43
Figura 22 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de <i>Cicer arietinum</i> ‘Kabuli’ cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado <i>Phytophthora cinnamomi</i>	47
Figura 23 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de <i>Lupinus albus</i> cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado <i>Phytophthora cinnamomi</i>	47
Figura 24 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de <i>Lupinus luteus</i> cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado <i>Phytophthora cinnamomi</i>	48
Figura 25 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de <i>Lupinus luteus</i> ‘Cardiga’ cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado <i>Phytophthora cinnamomi</i>	48
Figura 26 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de <i>Secale cereale</i> cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado <i>Phytophthora cinnamomi</i>	49
Figura 27 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de <i>Eruca sativa</i> cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado <i>Phytophthora cinnamomi</i>	50
Figura 28 – Percentagem de plantas obtidas no final do ensaio, quando cultivadas em solo artificialmente infestado e não infestado (controlo) com <i>Phytophthora cinnamomi</i>	51
Figura 29 – Peso seco médio por planta da parte aérea e da parte radicular cultivada em solo infestado e não infestado (controlo).....	52

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Área florestal total e áreas florestais do sobreiro e da azinheira (unidade = 1 000 ha)	3
Quadro 2 – Espécies mais comuns na flora do Sul de Portugal	7
Quadro 3 – Táxons seleccionados para os ensaios	21
Quadro 4 – Proveniência dos isolamentos testados e ensaios nos quais foram utilizados	23
Quadro 5 – Classificação do solo utilizado nos testes de patogenicidade (AG – areia grossa; AF – areia fina; L – limo; A – argila; MO – matéria orgânica)	23
Quadro 6 – Caracterização dos extractos aquosos radiculares (EARs) (mg/mL)	34
Quadro 7 – Resumo da análise da variância da de inibição no crescimento micelial (variável transformada – INIBt _{cm})	34
Quadro 8 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na C1 (50%) no crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	35
Quadro 9 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na C2 (75%) no crescimento micelial de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	36
Quadro 10 – Resumo da análise da variância da inibição da produção de esporângios (variável transformada - INIBt _e)	38
Quadro 11 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de esporângios de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (comparação de médias sem os dados dos EARs de <i>Lolium rigidum</i> e <i>Secale cereale</i>)	39
Quadro 12 – Dimensões (µm) médias dos esporângios produzidos em presença de extractos aquosos radiculares (EARs) e em condições óptimas (controlo)	40
Quadro 13 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na formação e libertação de zoósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	41
Quadro 14 – Germinação (%) de zoósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meio PARPH, formados e libertados a partir de esporângios produzidos em presença dos extractos aquosos radiculares (EARs)	42
Quadro 15 – Germinação de zoósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> em meio de V8 sólido com 75% de extractos aquosos radiculares (EARs), formados em condições normais	43
Quadro 16 – Resumo da análise da variância da percentagem de inibição na produção de clamidósporos (variável transformada – INIBt _c)	44
Quadro 17 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de clamidósporos de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	45
Quadro 18 – Dimensões (µm) médias dos clamidósporos produzidos em presença de extractos aquosos radiculares (EARs) e em condições óptimas (controlo)	46
Quadro 19 – Avaliação do estado fenológico (escala BBCH), dos sintomas das plantas cultivadas no controlo e em solo artificialmente infestado com <i>P. cinnamomi</i> , percentagem de reisolamento de <i>P. cinnamomi</i> (%RI) a partir das raízes e número de proágulos por grama de solo seco (PRP/g)	53
Quadro 20 – Resumo dos resultados obtidos em todos os ensaios	58

LISTA DE ABREVIATURAS

- a.C. – antes de Cristo
- AFN – Autoridade Florestal Nacional
- APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça
- d.C. – depois de Cristo
- BBCH – Bayer, BASF, Ciba-Geigy e Hoechst
- BRCDI – *Brachypodium distachyon*
- BRSNI – *Brassica nigra*
- C0 – concentração 0% de extracto aquoso radicular (controlo)
- C1 – concentração 50% de extracto aquoso radicular
- C2 – concentração 75% de extracto aquoso radicular
- Ca²⁺ – Cálcio
- CIEAR – *Cicer arietinum*
- DGAV – Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária
- DGRF – Direcção-Geral dos Recursos Florestais
- DP – desvio padrão
- Cm/Lm – razão comprimento médio / largura média
- Col. – colónias
- EAR – extracto aquoso radicular
- EARc – extracto aquoso radicular combinado das espécies *Eruca sativa* e *Raphanus raphanistrum*
- ERUVE – *Eruca sativa*
- ESA – European Space Agency
- F(calc) – valor de F calculado
- Fosetil-Al – fosetil-alumínio
- g – grama
- GL – graus de liberdade
- HORMU – *Hordeum murinum*
- %INIB_c – percentagem de inibição da produção de clamidósporos
- %INIB_{cm1} – percentagem de inibição do crescimento micelial em extractos na C1 (50%)
- %INIB_{cm2} – percentagem de inibição do crescimento micelial em extractos na C2 (75%)
- %INIB_e – percentagem de inibição da produção de esporângios
- %INIB_f – percentagem de inibição da formação de zoósporos
- %INIB_g – percentagem de inibição da germinação de zoósporos
- %INIB_v – percentagem de inibição da viabilidade de zoósporos
- ICNB – Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade
- ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas
- INE – Instituto Nacional de Estatística
- INIB_t – variável ‘inibição’ sujeita a transformação
- INIB_{t_c} – variável sujeita a transformação - ‘inibição da produção de clamidósporos’

INIBt_{cm1} – variável sujeita a transformação - ‘inibição do crescimento micelial na C1’
INIBt_{cm2} – variável sujeita a transformação - ‘inibição do crescimento micelial na C2’
INIBt_e – variável sujeita a transformação - ‘inibição da produção de esporângios’
INF – Inventário Nacional Florestal
INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrícola e Veterinária
K – potássio
kg - quilograma
K₂O – óxido de potássio
KNO₃ – nitrato de potássio
M – valor médio
Máx. – valor máximo registado
Min. – valor mínimo registado
mg – miligrama
mL – mililitro
mm – milímetro
N – azoto
n.a. – Não aplicável
NASA – National Aeronautics and Space Administration
LOLRI – *Lolium rigidum*
LUPAL – *Lupinus albus*
LUPLU. – *Lupinus luteus*
P – fósforo
P₂O₅ – pentóxido de fósforo
PARPH – piramicina, ampicilina, rifampicina, pentacloronitrobenzeno (PCNB), himexazol
Pc – *Phytophthora cinnamomi*
PDA – gelose de batata dextrosasa
PIB – Produto Interno Bruto
PLMPU – *Phlomis purpurea*
Pr(>F) – *p-value*
QM – quadrado médio
r – repetições
RAPRA – *Raphanus raphanistrum*
RI – reisolamento
rpm – rotações por minuto
SECCE – *Secale cereale*
SQM – soma dos quadrados médios
V8 – sumo de 8 vegetais (agrião, aipo, alface, beterraba, cenoura, espinafre, salsa, tomate)
µm – micrómetro
°C – graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento e objectivos do trabalho

Esta dissertação de mestrado surge no seguimento de um trabalho desenvolvido no INIAV (Oeiras) cujo objectivo é desenvolver pastagens melhoradas com espécies da flora mediterrânica que apresentem efeito alelopático em *Phytophthora cinnamomi*.

A mitigação do declínio dos Montados requer estratégias que combinem diferentes métodos de gestão do montado integrando essencialmente medidas preventivas para evitar novas infecções e medidas culturais que possam reduzir a infecção do patógeno. É necessário desenvolver novos meios de controlo deste agente patogénico do solo, meios esses que devem ser práticos, eficazes, com baixos custos e devem estar ao acesso de todos os produtores e proprietários. Assim realizaram-se estudos de alelopatia (meio de luta cultural) com o objectivo de seleccionar espécies de plantas que tenham um efeito inibitório para o Oomiceta para posterior incorporação em pastagens semeadas.

Desta forma, os objectivos do trabalho foram avaliar, em ensaios *in vitro*, o efeito de extractos aquosos radiculares de espécies de plantas previamente seleccionadas no crescimento micelial, na produção de estruturas assexuadas e na germinação e viabilidade de zoósporos. Realizaram-se ainda testes de patogenicidade para avaliar a susceptibilidade dessas espécies de plantas à infecção causada por *P. cinnamomi*.

1.2 O Montado

O Montado é um ecossistema agro-silvo-pastoril, complexo, rico em biodiversidade e característico da zona sul do Mediterrâneo. Neste ecossistema conjugam-se diversas actividades, como por exemplo, a apicultura, o cultivo de plantas aromáticas e medicinais bem como o cultivo de cogumelos, a produção de bolota e de cortiça, a criação de gado e culturas de pastagens e cereais (Marcelino, 2001; Pinto-Correia *et al.*, 2013; Rocha, 2005). As formações de espécies florestais mais comuns são as do género *Quercus*, designadamente *Quercus suber* L. (sobreiro) e *Quercus rotundifolia* Lam. (azinheira) (Pinto-Correia e Mascenhas, 1999). Este ecossistema apresenta uma densidade de 80 a 120 árvores por hectare, conjugadas com espécies espontâneas. Da área total, cerca de 5 % pode ser utilizada para culturas cerealíferas e 40 % para pastagens (APCOR, 2016).

Os Montados apresentam um elevado grau de biodiversidade decorrente das características peculiares do clima mediterrânico, caracterizado por Verões quentes e secos e Invernos frios e húmidos (Sundseth, 2010). Na fauna, encontram-se inúmeras espécies de animais endémicas, designadamente o linco Ibérico *Lynx pardinus* Temminck que se encontra ameaçado de extinção (Associação Portuguesa da Cortiça - APCOR, 2016). A flora é dominada por árvores do género *Quercus* envolvidas por camadas de sobcoberto de mato e arbustos (tema desenvolvido no capítulo 1.1.2 – A vegetação do Montado).

De acordo com Palma *et al.* (2014), que citam dados da AFN (Autoridade Florestal Nacional), os Montados exercem ainda uma função importante no sequestro de carbono, já que representam

30% do carbono presente nas florestas portuguesas. Os Montados desempenham ainda um papel preponderante na protecção dos solos contra a erosão e na regulação hídrica (Rêgo *et al.*, 2008).

Os bosques mediterrânicos têm vindo a ser desenvolvido pelo Homem desde há 9000 anos (Pinto-Correia *et al.*, 2013). O interesse por estas quercíneas, sobreiro e azinheira, aparece logo no século VII. O Montado teve origem, como sistema agro-silvopastoril, no século XII (Pinto da Fonseca, 2009; Pinto-Correia *et al.*, 2013). No reinado de D. Dinis (1279-1325) surgem as cartas de criação de coutadas, nas quais se inseriam medidas com o intuito de proteger o sobreiro e a azinheira. Estas medidas proibiam práticas que causassem danos a estas árvores (queimadas, cortes indevidos ou colheita indiscriminada de frutos e ramos) bem como as respectivas punições para quem desrespeitasse a lei. Por outro lado, eram atribuídas compensações a quem protegesse os sobreirais e os azinhais (Pereira, 2009).

As leis que visam a protecção do Montado foram continuando a ser promulgadas, com particular ênfase nos séculos XIX e XX, devido à crescente importância da cortiça na indústria vitivinícola e em particular no vinho do Porto. Em 2012, o sobreiro foi classificado como árvore nacional (Decreto-Lei n.º 117 – II série, 2012).

Os Montados encontram-se principalmente ao longo da bacia do Mediterrâneo (Fig. 1). Em Portugal, a área de Montados de sobreiro é, actualmente, cerca de 736 755 hectares, o que equivale a 34% da área mundial de Montados. Espanha também detém uma área de Montados considerável, o que faz com que 61% da área mundial de Montados esteja localizada na Península Ibérica (APCOR, 2016; Ceia e Ramos, 2016).

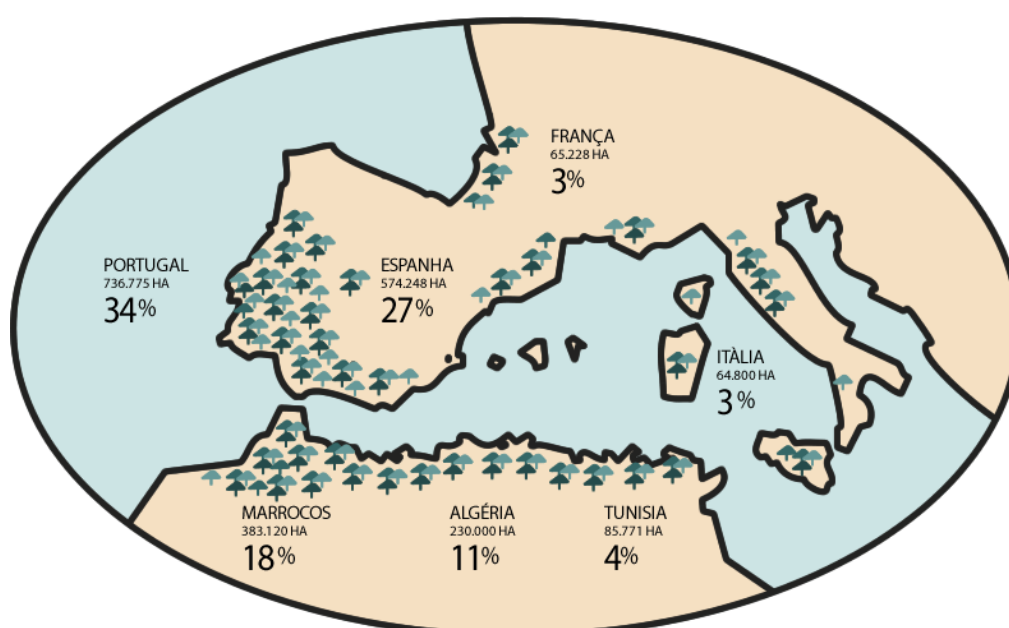


Figura 1 – Distribuição da área de Montado na zona do Mediterrâneo (APCOR, 2016)

Actualmente, este ecossistema encontra-se ameaçado devido ao enfraquecimento das suas espécies arbóreas, o que tem conduzido ao seu declínio (Simões *et al.*, 2015).

1.2.1 O sobreiro e a azinheira

O sobreiro e a azinheira são duas espécies presentes na Bacia do Mediterrâneo pertencentes ao género *Quercus*, família Fagaceae, e que ocorrem em Portugal tanto plantadas

como espontâneas (Espírito Santo, 1991; Patacho, 2016). Estas espécies têm um peso bastante significativo na floresta portuguesa, ocupando cerca de 34% da área florestal nacional (Fig. 2).

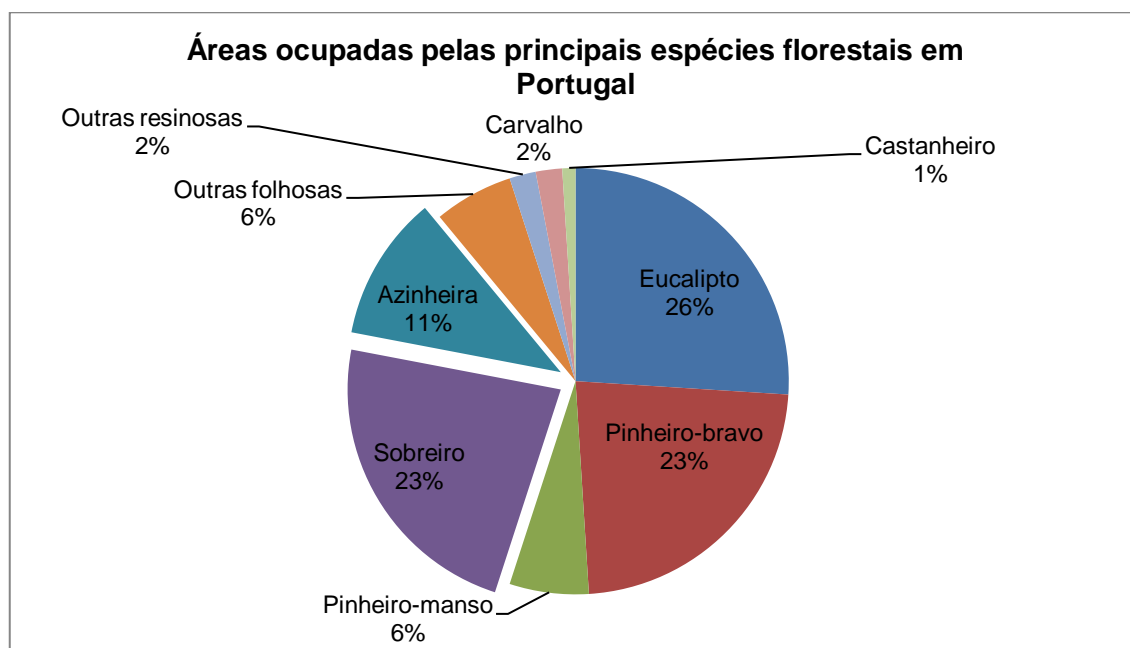


Figura 2 – Áreas ocupadas pelas principais espécies florestais em Portugal (dados do 6º INF, 2013)

De acordo com as Estatísticas Agrícolas (INE, 2016), entre 2005 e 2010 a área florestal total decresceu cerca de 39 800 hectares, o que corresponde a uma redução de 1,2% a uma taxa de menos 7 960 hectares por ano. Apenas se registou um aumento na área florestal no Arquipélago dos Açores. No mesmo período, verificou-se também uma redução de 3 700 hectares na área total de azinheira, apesar de ter tido um ligeiro aumento de 300 hectares na zona do Algarve. Todavia, a área de ocupação do sobreiro aumentou aproximadamente 5 400 hectares, tendo apenas uma redução na zona de Lisboa de 200 hectares (Quadro 1).

Quadro 1 – Área florestal total e áreas florestais do sobreiro e da azinheira (unidade = 1 000 ha) (INE, 2016)

	Floresta (total)		Sobreiro		Azinheira	
	2005	2010	2005	2010	2005	2010
Portugal	3299,9	3 260,1	711,8	717,2	329,4	325,7
Norte	566,4	548,5	12,4	12,6	2,1	2,1
Centro	1 081,7	1 046,6	34,9	35,4	14,9	14,3
Lisboa	67,0	65,1	16,3	16,1	1,1	1,1
Alentejo	1 354,4	1 352,3	619,4	622,3	302,5	299,1
Algarve	142,4	142,3	30,9	30,9	8,9	9,2
Açores	55,4	72,9	0	0	0	0
Madeira	32,7	32,2	0	0	0	0

No entanto, nos últimos anos tem-se assistido a uma reflorestação de sobreiros e de outras espécies florestais, principalmente nas zonas afectadas pelos incêndios. Ao abrigo do projecto

Floresta Comum, de 2010 a 2016 foram replantadas 445 222 árvores autóctones de Portugal em 162 municípios (Projecto Floresta Comum, 2016).

Neste sentido, na Fig. 3, apresenta-se o mapa de Portugal Continental com a distribuição das principais espécies florestais. Em Portugal, o sobreiro e a azinheira estão presentes em todo o país, à excepção dos arquipélagos dos Açores e da Madeira, mas com maior implantação na zona sul. Efectivamente, segundo os dados disponibilizados pelo INE (2016), cerca de 86% dos sobreiros e 91% das azinheiras estão localizados no Alentejo (Quadro 1). As áreas acima do Tejo são dominadas pelo pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton) e pelo eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), o pinheiro-manso (*Pinus pinea* L.) está muito concentrado no distrito de Setúbal, já o castanheiro (*Castanea sativa* Mill.), que corresponde a 1% da área florestal, encontra-se sobretudo em Trás-os-Montes.

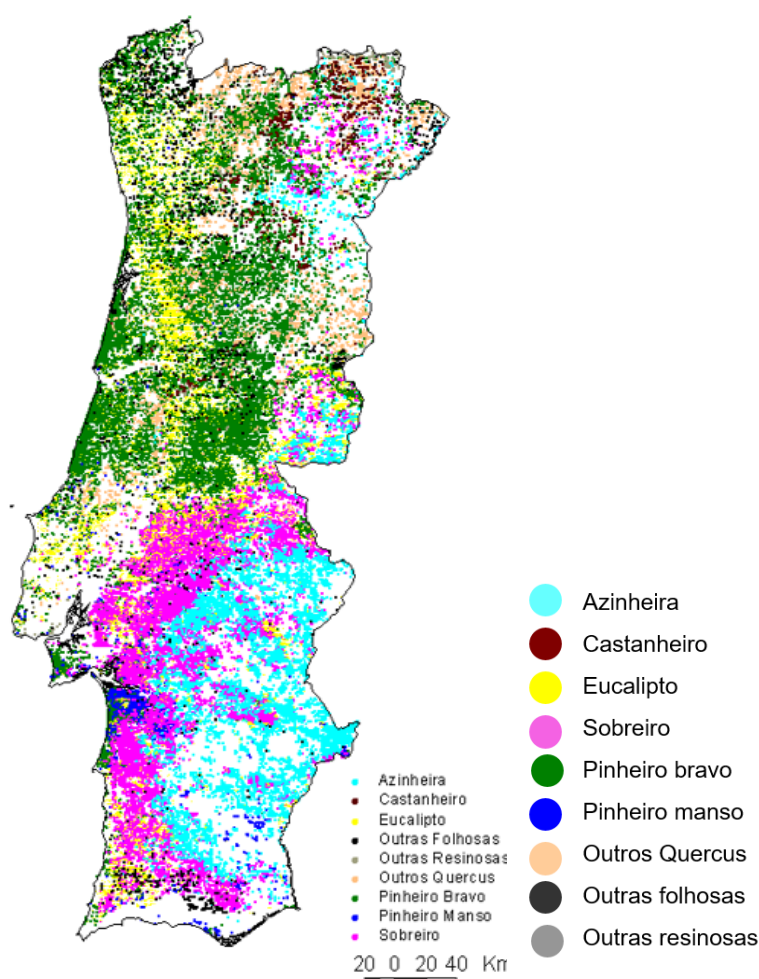


Figura 3 – Mapa de distribuição das principais espécies florestais em Portugal Continental (ICNF, 2013)

O sobreiro é uma árvore que pode atingir os 25 metros de altura e encontra-se em zonas de baixa altitude até aos 156 metros, no entanto pode estar presente em locais até aos 950 metros. A azinheira também pode apresentar grande porte atingindo em média 8 a 12 metros de altura, estando mais presente em zonas até aos 350 metros embora possa ser encontrada em altitudes até 1400 metros (Flora.on - Sociedade Portuguesa de Botânica, 2016; Rigo e Caudullo, 2016).

A azinheira encontra-se preferencialmente em áreas de influência continental e mediterrânica, prefere solos calcários e compactos, não tolerando solos siliciosos e desagregados bem como solos excessivamente arenosos e salinos (Cela *et al.*, 1998; Costa, 1990). Por sua vez, o sobreiro prefere climas com influência atlântica e mediterrânica, vegeta bem em solos ácidos com pH entre 5 e 7, de textura arenosa e pouco férteis, no entanto não tolera solos calcários (Pinto-Correia *et al.*, 2013; Ribeiro, 2008).

O sobreiro prefere zonas com poucas oscilações térmicas, entre os 10 e os 30°C, não tolerando temperaturas abaixo dos -10°C. Já a azinheira tolera melhor baixas temperaturas no Inverno, podendo ir até aos -3°C, e temperaturas até pelo menos 28°C no Verão, suportando Invernos frios e Verões quentes. O nível de precipitação ideal para ambas as espécies encontra-se entre os 300 e os 1500 mm (Flora.on – Sociedade Portuguesa de Botânica, 2016; Natividade, 1950).

Os Montados de sobreiro destinam-se principalmente à produção de cortiça, apesar da sua semente, a lande, também ser utilizada. No entanto, a principal fonte de rendimento dos Montados de azinho é a produção de bolota, muito utilizada na alimentação animal (Patacho, 2016).

Inicialmente, a bolota tinha uma importância superior à da cortiça. Na Idade do Bronze os povos utilizavam a bolota para consumo próprio bem como na alimentação do gado, mais tarde, na Idade do Ferro, as populações desenvolveram o pão de bolota (Pinto da Fonseca, 2009).

As primeiras referências à cortiça datam do ano 3000 a.C. no Egito e na Pérsia. A cortiça era utilizada por estas civilizações em aparelhos de pesca. Durante o período clássico greco-latino, que decorreu entre o século VII a.C. e o século V d.C., a cortiça era incorporada na construção de flutuadores de vários tipos, na construção de colmeias, sendo também usada nas solas do calçado. Já o filósofo grego Teofrasto (século III d.C.) ficou maravilhado com a capacidade do sobreiro em renovar a sua “casca” (APCOR, 2016).

Apesar de no século XIV se exportar cortiça para o Reino Unido, é contudo partir do século XVII que este produto começa a ganhar importância económica devido ao seu crescente uso como isolante para vedar os recipientes usados na conservação do vinho e ainda no fabrico de rolhas, conforme resultado da crescente actividade Vitivinícola em Portugal. (Pinto-Correia *et al.*, 2013). Presentemente, o sector da cortiça, que representa 0,7% do PIB (Direcção Geral dos Recursos Florestais – DGRF, 2007) está intimamente associado à indústria Vitivinícola que, segundo o INE (2009) abarca 66% da cortiça produzida. Por outro lado, o sector da construção civil consome 21% da cortiça. No entanto, as aplicações da cortiça têm vindo a ser mais diversificadas, como seja em acessórios, em vestiário, em calçado e ainda na tecnologia (como por exemplo: transportes, construção, vaivéns da NASA e da ESA, caiaques de alta competição, nas bolas de ténis e de críquete, na decoração, entre outros) (APCOR, 2016).

Portugal é líder na produção de cortiça, com 49% da produção mundial (APCOR, 2016), no entanto, cerca de 90% da cortiça transformada é destinada à exportação (INE, 2009).

1.2.2 A vegetação do Montado

A zona Mediterrânica, conhecida pela sua riqueza em biodiversidade, tem cerca de 13 000 espécies de plantas endémicas e 150 espécies florestais endémicas. Nos Montados, distribuídos ao longo da bacia do Mediterrâneo (referido em 1.1 – O Montado), registaram-se cerca de 135 espécies

herbáceas diferentes por km² (APCOR, 2016), evidenciando também um elevado grau de biodiversidade.

O ecossistema Montado é muito rico em flora herbácea e florestal, tal como mencionado anteriormente, e foi criado pelo Homem através da abertura do Bosque Mediterrânico, da manutenção do pastoreio bem como de práticas agrícolas no seu sobcoberto, “definindo uma paisagem peculiar no Sul da Península Ibérica” (Leitão, 2000). As transformações das florestas primordiais conduziram a uma paisagem constituída pelas árvores remanescentes dos antigos bosques, onde as quercíneas dominam com extensas áreas de sobreiro e azinheira.

Os Montados de *Quercus* spp. foram qualificados como “habitats” de interesse comunitário (habitat 6310 – Rede Natura 2000) pelas Comunidades Europeias no ano de 1992. Neste “habitat”, para além das quercíneas presentes, apontam-se os matagais formados por *Arbutus unedo* L. (medronheiro), *Q. coccifera* L. (carrasco), *Myrtus communis* L. (murta), *Rosmanirus officinalis* (rosmaninho), *Lavandula* spp. (lavandas), entre outras. Por outro lado, as pastagens também estão presentes, representadas por espécies vivazes de elevada biomassa tais como *Poa bulbosa* L., *Trifolium subterraneum* subsp. *oxaloides* (Bunge) P. Cout (trevo subterrâneo), *T. subterraneum* subsp. *subterraneum* (Katz. et Morley) Zohary, *T. suffocatum* L. (trevo-estrangulado), *T. tomentosum* L. (trevo-tomentoso), *T. nigrescens* Viv. (trevo-escuro), *Herniaria glabra* L. (herniaria), *Parentucellia latifolia* (L.) Caruel, *Bellis annua* L. (margarida-anual), *B. sylvestris* Cirillo (margarida-do-monte), *Erodium botrys* (Cav.) Bertol. (agulheta), *Gynandris sisyrinchium* (L.) Parl. (lírio-roxo), *Leontodon tuberosus* L. (leituga-tuberosa), *Carex divisa* Huds. (carriço-dividido), *Paronychia argentea* Lam. (erva-dos-unheiros), *Astragalus cymbicarpus* Brotero (saveirinho), *Onobrychis humilis* (L.) G. López, *Hypochoeris radicata* L. (leituga), *Merendera filifolia* Camb. (quinta-merendas), *Plantago serraria* L. (pé-de-corvo), *Ranunculus bullatus* L. (ranúnculo-bolhado), e algumas espécies anuais designadamente *Ornithopus* sp. (serradelas), *Astragalus* sp. (astrálagos), *Vicia* sp. (ervilhacas) (ICNB, 200-; Projecto Life Habitat Lince Abutre, 2014).

Nas pastagens ocorrem plantas endémicas e com estatuto de protecção, designadamente as duas espécies de narcisos *Narcissus fernandesii* Pedro e *N. cavanillesii* Barra & G. López, *Armeria pinifolia* (Brot.) Hoffmanns & Link e ainda *Centaurea coutinhoi* Franco. Em situações menos comuns, o coberto arbóreo dominado por sobreiro ou azinheiro é completado por alguns carvalhos como *Quercus faginea* subsp. *broteroi* (Cout.) A. Camus, *Q. pyrenaica* Willd., *Q. marianica* C. Vicioso e *Q. robur* subsp. *estremadurensis* (O. Schwarz) A. Camus (Pinto Correia *et al.*, 2013).

Para além das espécies integrantes da vegetação dos Montados, discriminadas acima, no Quadro 2 estão ainda referidos alguns dos géneros e espécies mais comuns de herbáceas presentes no Sul de Portugal, local onde está concentrada a maior área de Montados do país (Miguel, 2014; Pacheco, 2009; Saavendra e Pastor, 1994).

Quadro 2 – Espécies mais comuns na flora do Sul de Portugal

Família	Espécie		Tipo fisionómico
	Nome científico	Nome comum	
Brassicaceae	<i>Brassica nigra</i> (L.) W. D. J. Koch in Röhl.	Mostarda-negra	Terófito
	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Saramago	Terófito
	<i>Sinapis alba</i> L.	Mostarda-branca	Terófito
	<i>Sinapis arvensis</i> L.	Mostarda-dos-campos	Terófito
Cistaceae	<i>Cistus</i> spp.	Rosêlhas	Nanofanerófito
	<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	Giesteira-das-vassouras	Nanofanerófito
Fabaceae	<i>Medicago</i> spp.	Luzernas	Terófito
	<i>Ononis natrix</i> L.	Joina-dos-matos	Nanofanerófito
	<i>Trifolium</i> spp.	Trevos	Terófito
	<i>Vicia</i> spp.	Ervilhacas	Terófito
Lamiaceae	<i>Lavandula</i> spp.	Lavandas	Nanofanerófito
	<i>Phlomis purpurea</i> L.	Mariola	Nanofanerófito
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim	Nanofanerófito
	<i>Thymus camphoratus</i> Hoffmanns. et Link	Tomilho	Caméfito
Poaceae	<i>Brachypodium distachyon</i> (L.) P. Beauv.	Braquipódio	Terófito
	<i>Bromus diandrus</i> Roth	Espigão	Terófito
	<i>Hordeum murinum</i> L.	Cevada-dos-ratos	Terófito
	<i>Lolium rigidum</i> Gaudin	Azevém	Terófito

Os Montados são apontados como ecossistemas de um valor inestimável na conservação e preservação da paisagem bem como na “manutenção da biodiversidade florística e faunística” (ICNB, 200-), devendo ser levadas a cabo medidas que actuem ao nível da protecção deste ecossistema.

1.3 O declínio do Montado

Desde 1900 que os Montados no sul da Europa começaram a evidenciar sinais de declínio e mortalidade (Brasier, 1996). Segundo Moreira (2014), a morte de sobreiros é descrita em Portugal desde 1898 pelo Professor Veríssimo d’Almeida.

De acordo com Godinho *et al.* (2016), entre 1990 a 2006 o Montado perdeu uma área de cerca de 90 mil hectares, o que equivale a uma taxa de 0,14% por ano. Os mesmos autores indicam ainda que nos Montados de sobre e azinho do Sul de Portugal esta redução se deveu sobretudo a práticas menos correctas de gestão do solo, designadamente o pastoreio intensivo, combinadas com factores ambientais e espaciais.

O declínio do Montado é um problema cujas causas são de difícil diagnóstico dada a complexidade do ecossistema. É apontado como o resultado de uma interacção de factores bióticos e abióticos (Ferreira, 2001; Sousa *et al.*, 2007).

As pragas e as doenças são os factores bióticos frequentemente associados ao declínio (Braisier, 1996; Souza, 2012).

Os principais insectos associados ao declínio dos Montados são os desfolhadores visto que tornam a árvore mais vulnerável a ataques de xilófagos. Os insectos desfolhadores afectam a árvore a nível fisiológico, causando o seu enfraquecimento gradual, já os insectos xilófagos são consideradas mais graves já que se alimentam directamente da madeira e causam galerias nos troncos, conduzindo à morte da árvore. De entre os insectos xilófagos, destaca-se o *Platypus cylindrus* Fab., um coleóptero que é ainda um vector de uma espécie de fungo (*Biscogniauxia mediterranea* (de Not) Kuntze). De acordo com Inácio *et al.* (2011), este insecto pode causar a morte da árvore em poucos meses.

Nas zonas afectadas pelo declínio, podem ser isolados organismos patogénicos, designadamente os fungos *Botryosphaeria corticola* A. J. L. Philips, Alves et Luque e *Biscogniauxia mediterranea* (de Not) Kuntze. *B. corticola* é um Ascomiceta que causa cancrios nos ramos em várias espécies de *Quercus*, designadamente em sobreiros e azinheiras. Estes cancrios caracterizam-se por rachas alongadas no tronco que por vezes apresentam picnídeos de cor escura. Ao cortar os ramos com cancrios, é possível verificar a necrose dos feixes vasculares, designadamente do floema (Mullerin e Smith, 2015). Já *B. mediterranea* é responsável pela doença do carvão do entrecasco. As árvores afectadas apresentam cloroses e desfoliação, fendilhamento no tronco e nos ramos bem como exsudados de cor castanha na zona do tronco (Henriques *et al.*, 2014). Todavia, Santos (2003) aponta para um comportamento predominantemente saprofítico deste fungo e relata que *B. mediterranea* ocorre geralmente em árvores em avançado estado de declínio, pelo que não se pode classificar este fungo como agente primário desta doença. Nas raízes, o Oomiceta *Phytophthora cinnamomi* Rands é detectado com elevada frequência tanto em sobreiro como em azinheira (Alves *et al.*, 2004; Brasier, 1996; Santos, 2003; Sousa *et al.*, 2007), tendo sido isolado pela primeira vez por Lopes-Pimentel em 1945 a partir de raízes de sobreiros doentes na região de Santarém (Moreira, 2014).

P. cinnamomi e *B. corticola* são organismos considerados como agentes patogénicos primários do declínio do sobreiro e da azinheira (Branco *et al.*, 2014).

Inúmeros estudos mostram a elevada presença de *P. cinnamomi* nos solos na Península Ibérica em áreas de Montado de *Quercus* spp. em declínio, sendo o patógeno isolado com maior frequência (Moreira-Marcelino, 2001; Moreira e Martins, 2005; Robin *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2003). Estes estudos revelam uma estreita associação de *P. cinnamomi* com o enfraquecimento e morte dos sobreiros e azinheiras, o que leva a que vários autores considerem que este patógeno é o principal agente causal do declínio nos Montados (Brasier, 1996; Brasier *et al.*, 1993; Moreira e Martins, 2005; Scanu *et al.*, 2013). Em Portugal, as zonas mais afectadas por *P. cinnamomi* são o Centro e o Sul (Moreira e Martins, 2005).

De entre os factores abióticos há a destacar o tipo de solo. Moreira e Martins (2005) apontam uma maior presença de sobreiros doentes em solos pouco profundos, de textura fina, com elevados teores de argila e limo e com elevada capacidade de armazenamento de água, como por exemplo, nos Leptossolos e nos Luvisolos. Estes solos delgados, associados à presença de água livre, favorecem a infecção das raízes por *P. cinnamomi*. Por outro lado, foi observado que os solos com baixa fertilidade e baixo teor de nutrientes minerais, em particular com pouco fósforo, azoto e cálcio também potenciam as infecções. Costa *et al.* (2009) referem ainda as encostas expostas a sul com

declives até 15% como zonas que oferecem um maior risco para o declínio, o que confere com os estudos de Moreira e Martins (2005).

1.3.1 Sintomatologia

O desenvolvimento da doença do declínio associado a *P. cinnamomi* pode seguir duas vias: decrepitude progressiva ou morte súbita (Cobos *et al.*, 1993; Moreira e Martins, 2005).

A decrepitude progressiva é descrita como um declínio progressivo e lento da árvore, na qual se verifica o amarelecimento (clorose) e queda prematura das folhas, com a consequente perda de densidade da copa. Ocorre a morte progressiva das extremidades dos ramos e rebentos (dieback) (Fig. 4 – A), emissão de ramos novos com folhas de tamanho reduzido a partir de ramos aparentemente secos e verifica-se o aparecimento de exsudados na zona do colo e ao longo do tronco (Fig. 4 - B). No sistema radicular pode observar-se a morte de raízes finas e lesões em raízes de maior diâmetro, podendo, entretanto, a árvore permanecer viva durante vários anos (Cobos *et al.*, 1993; Moreira e Martins, 2005; Tuset *et al.*, 1996).

A morte súbita pode ocorrer em árvores jovens ou adultas. Esta situação é caracterizada pela seca súbita de toda a copa com a permanência das folhas castanhas agarradas ao tronco (Fig. 5) ainda durante algum tempo. A morte da árvore ocorre num curto espaço de tempo, por vezes em menos de uma semana (Cobos *et al.*, 1993; Moreira e Martins, 2005; Tuset *et al.*, 1996).



Figura 4 – Sintomas de declínio em sobreiro (A - *dieback* e desfoliação; B – exsudados no tronco) (Moreira, 2014; Tuset *et al.*, 1996)



Figura 5 – Árvore afectada pela morte súbita (Moreira, 2014)

1.4 Biologia e ecologia de *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi é um patogénio de plantas que habita o solo. Foi isolado pela primeira vez, em 1922, a partir de árvores da canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) na ilha da Sumatra (Zentmyer, 1980). *P. cinnamomi* faz parte de um grupo de organismos que apresentam características que se assemelham a fungos mas não o são devido às diferenças a nível celular e reprodutivo. Este organismo pertence ao reino Chromista, à classe Oomycota, ordem Pythiales e família Pythiaceae (Rossman e Palm, 2006) e teve origem na Papua Nova-Guiné, tendo sido introduzido no Havai, Sul da Austrália, África Central e nos continentes Americano e Europeu (Zentmyer 1980).

P. cinnamomi é um patogénio generalista, responsável pelo declínio e morte em inúmeras espécies florestais, agrícolas e ornamentais, tendo como hospedeiros mais de 3000 espécies (Brasier, 2008). Na zona mediterrânica, *P. cinnamomi* também tem sido associado à doença da tinta do castanheiro (*Castanea sativa*) (Newhook e Podger, 1972). Mais recentemente, este patogénio foi associado ao declínio do sobreiro e da azinheira (Brasier, 1996; Brasier *et al.*, 1993; Moreira e Martins, 2005; Tuset *et al.*, 1996).

Estudos com base em modelação climática indicam que a actividade deste patogénio pode aumentar bem como as áreas afectadas, no entanto a sua actividade não irá atingir as zonas com Invernos mais frios e rigorosos, designadamente o Noroeste e Centro da Europa (Brasier, 1996).

Este organismo vive no solo e nas raízes de plantas. Em condições ambientais adversas (secas e baixas temperaturas) *P. cinnamomi* produz clamidósporos (Zentmyer e Mircetich, 1966) que, em condições favoráveis, germinam e dão origem a micélio ou a esporângios.

Os clamidósporos (Fig. 6 - A) são formados a partir da “fragmentação das hifas ou parte delas, depois de terem sofrido uma diferenciação que se traduz no espessamento e, muitas vezes, escurecimento da membrana e na acumulação de reservas nutritivas” (Lima A., 2014). São

estruturas de forma esférica, com uma parede espessa e lisa, com dimensões que variam entre os 31 e os 50 μm de diâmetro (Caetano *et al.*, 2010; Erwin e Ribeiro, 1996). Estes esporos são considerados estruturas de resistência visto que podem persistir no solo ou nas raízes de plantas herbáceas hospedeiras durante longos períodos de tempo e ser uma fonte de inóculo de reserva até que as condições voltem a ser favoráveis (Crone *et al.*, 2013).

Os esporângios (Fig. 6 - B) são estruturas assexuadas que vão dar origem a outro tipo de esporos, os zoósporos, que são responsáveis pelas infecções primárias das raízes e pela disseminação do patógeno no solo. Como *P. cinnamomi* é um organismo muito plástico, as dimensões dos esporângios variam muito de acordo com o isolamento, atingindo valores entre 11-103 x 11-53 μm (Caetano *et al.*, 2010; Erwin e Ribeiro, 1996).

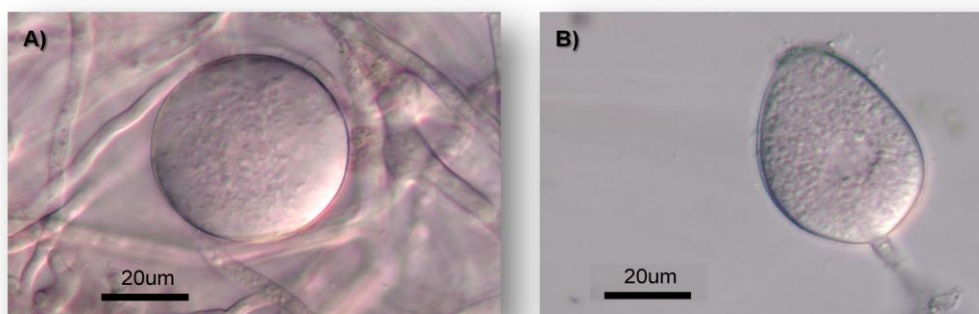


Figura 6 – Clamidósporo (A) e esporângio (B) de *Phytophthora cinnamomi* produzidos em suspensão de solo não estéril, com incubação a 20°C

A esporogénese de *P. cinnamomi* é estimulada por microrganismos do solo, designadamente por bactérias (Ayers, 1971; Zentmyer e Marshall, 1959). Segundo Zentmyer e Chen (1969), o solo filtrado por filtros que eliminam bactérias ou autoclavado perde as propriedades potenciadoras da esporulação.

Os zoósporos são considerados os propágulos primários de dispersão de *P. cinnamomi*, daí que o seu conhecimento, de extrema importância, pode trazer ferramentas no controlo da disseminação do patógeno (Pistininzi *et al.*, 2014). Os zoósporos, esporos biflagelados e móveis, ao serem libertados, são atraídos para as plantas devido à emissão de exsudados radiculares por raízes jovens. A libertação dos zoósporos é desencadeada por sinais pouco conhecidos e estudados, no entanto, alguns autores crêem que este fenómeno envolve aumentos do Ca^{2+} no citoplasma e ainda do seu pH (Hardham, 2005; Jackson e Hardham, 1996). Os aminoácidos, os açúcares e o etanol são algumas das substâncias que mais atraem estes esporos (Carlile, 1983; Erwin e Ribeiro, 1996). Ao entrarem em contacto com a raiz, estes esporos perdem os flagelos, segregam uma substância adesiva e em 5 a 10 minutos enquistam. Após 20 a 30 minutos, os quistos germinam e formam o haustório, uma estrutura que emite os tubos germinativos e tem um papel fundamental na obtenção de nutrientes a partir do hospedeiro (pode formar-se nas células corticais). Estas estruturas penetram as células da raiz e ramificam, formando micélio no interior do hospedeiro (Erwin e Ribeiro, 1996; Hardham, 2001). O crescimento do micélio no hospedeiro pode ocorrer tanto de forma intercelular como intracelular. Em 2 ou 3 dias, o patógeno esporula e produz clamidósporos nas células corticais

do hospedeiro e esporângios na superfície das raízes. Os esporângios, ao germinarem, libertam zoósporos que irão dar origem a um novo ciclo da doença e, por conseguinte, disseminar a infecção. Desta forma, *P. cinnamomi* é responsável por uma doença policíclica (Hardham, 2001), isto é, sempre que existam condições favoráveis de temperatura e humidade, ocorre a formação de novos esporos.

Na Figura 7 está esquematizado o ciclo da doença causada por *P. cinnamomi*.

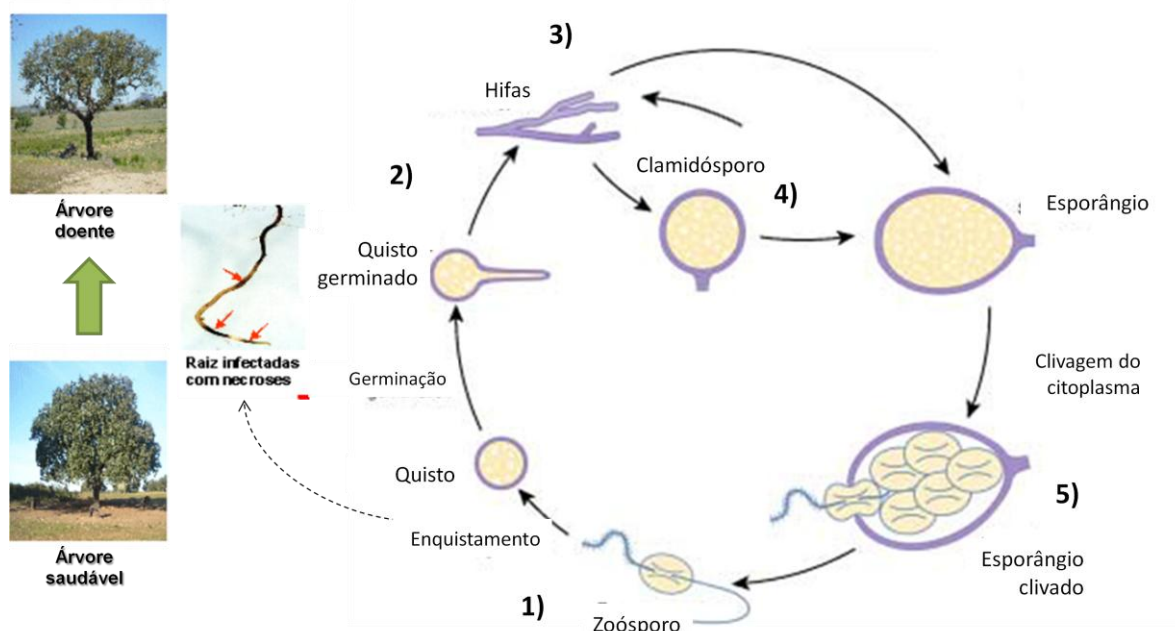


Figura 7 – Ciclo da doença causada por *Phytophthora cinnamomi* (Adaptado de Hardham, 2005 e Moreira, 2014)

1) Os zoósporos são atraídos para as raízes jovens de árvores saudáveis, enquistam e germinam; 2) Formam-se hifas que invadem o tecido do hospedeiro; 3) As hifas diferenciam-se em clamidósporos ou esporângios; 4) Os clamidósporos diferenciam-se em hifas ou esporângios; 5) Os esporângios formam zoósporos que são libertados e iniciam um novo ciclo de infecção.

P. cinnamomi é um organismo heterotático com hifas A1 e A2, que se reproduz assexuada e sexuadamente (Hardham, 2005). O *mating type* A2 está amplamente distribuído, enquanto o tipo A1 apresenta uma distribuição mais restrita, designadamente na Papua Nova Guiné e na zona sul da África do Sul (Zentmyer, 1988).

Os oósporos são formados a partir da conjugação do oogónio (gametângio feminino) com o anterídio (gametângio masculino) (Fig. 8) ou por emparelhamento com culturas interespecíficas tais como *P. cambivora*, *P. cryptogea* e *P. parasitica* (Gouveia, 1993).

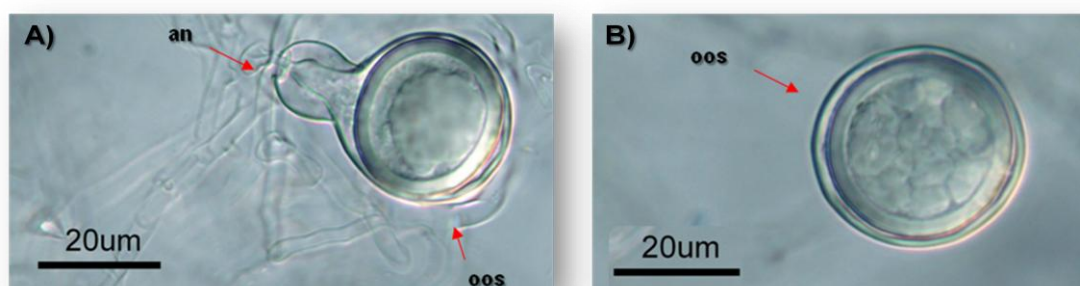


Figura 8 – Gametângios produzidos em cultura dupla a 25 °C em meio de cultura de extracto de cenoura-agar (CA). Oogónios esféricos, de parede lisa, com oósporos pleróticos e anterídios anfigínios: A) anterídio bicelular. an - anterídio; B) oos - oósporo.

Os oósporos são considerados estruturas de resistência, dado que podem persistir no solo durante um longo período de tempo (Zentmyer, 1980). Assim, este patógeno consegue sobreviver no solo sob a forma de clamidósporos, oósporos ou micélio inactivo por mais de seis anos (Mircetich e Zentmyer, 1967).

Como já foi referido, as infecções por *P. cinnamomi* são favorecidas pelo encharcamento do solo, presença de água livre e por temperaturas elevadas (cerca de 25°C) (Caetano *et al.*, 2010), como consequente, os danos mais graves ocorrem em áreas sujeitas a uma Primavera chuvosa seguida por Verões e Outonos quentes e secos (Erwin e Ribeiro 1996). As condições de humidade e temperatura da Primavera favorecem a diferenciação dos clamidósporos e a maturação dos esporângios que originam zoósporos e disseminam a infecção. Em condições de secas aliadas a temperaturas elevadas, os sistemas radiculares das árvores doentes não são capazes de resistir ao défice hídrico e acabam por morrer (Zentmyer 1980).

1.5 Medidas de controlo de *Phytophthora cinnamomi*

O controlo de *P. cinnamomi* é particularmente difícil (Brasier 2008), sendo um desafio para os proprietários, gestores e técnicos florestais. Um dos principais problemas reside no facto do controlo químico se ter mostrado ineficaz na erradicação de *P. cinnamomi* (D'Souza *et al.*, 2005). No caso particular das doenças radiculares, o seu diagnóstico tal como o seu tratamento são especialmente complicados. O diagnóstico é muitas vezes feito tardiamente visto que os sintomas de doenças radiculares se assemelham aos provocados por factores ambientais e só são visíveis um longo período após a infecção. Do mesmo modo, como os sintomas das doenças radiculares se desenvolvem inicialmente no sistema raiz-solo, muitas vezes não são detectados até começarem a aparecer sintomas na parte-aérea, o que conduz à destruição de grande parte do sistema radicular (Erwin e Ribeiro, 1996; Ferraz, 1985). Por consequente, as medidas de controlo só são aplicadas quando a doença já está muito avançada, o que condiciona a eficácia das mesmas (Caetano, 2007). Tais constatações levam a que o controlo de doenças radiculares tenha de ser essencialmente preventivo, iniciado no viveiro, na aquisição de plantas para plantação ou através de medidas culturais aquando da instalação das árvores no terreno.

Phillips e Burdekin (1992), citados por Caetano (2007), referem que as medidas de controlo de *P. cinnamomi* podem ser integradas em duas categorias: (1) medidas preventivas com as quais

se pretende evitar a introdução e disseminação do patógeno em zonas não infestadas (isentas de inóculo) e (2) medidas de controlo em áreas onde a doença já está instalada, com as quais se pretende reduzir o inóculo (estratégias de gestão integrada).

(1) As medidas preventivas pressupõem uma ampla gama de estratégias assentes sobretudo em boas práticas de gestão. De facto, vários autores apontam a importância da gestão de áreas com *P. cinnamomi* e o seu papel preponderante no controlo do declínio.

O conhecimento antecipado da presença do patógeno nos solos onde se irão instalar novas plantações ou proceder a reflorestações é muito importante na prevenção. Ao aproximar as condições ambientais, designadamente o solo, do óptimo para a árvore em questão, está-se a favorecer a sua resiliência a doenças (Caetano, 2007). Por outro lado, a manutenção de uma drenagem do solo adequada evita o stress hídrico por excesso de água, situação que predispõe as plantas à infecção pelo patógeno (Barros *et al.*, 2006).

A importância de uma fertilização adequada, particularmente com cálcio e fósforo, na prevenção de infecção por *P. cinnamomi* é indicada nas “Recomendações para a gestão de áreas com Fitoftora”, apresentadas no folheto do INIAV (2015). A fertilização cálcica inibe a produção de esporângios e zoósporos e por conseguinte diminui a capacidade de infecção do patógeno. (Serrano e Fernández-Rebollo, 2011). Também a incorporação de matéria orgânica no solo pode ser entendida como uma medida preventiva já que, para além de melhorar a estrutura do mesmo, aumenta a população de organismos antagonistas a *P. cinnamomi* (You e Sivasithamparam, 1995). Ao melhorar o solo, designadamente através da adubação ou pela incorporação de matéria orgânica, estamos a melhorar a boa vegetação da árvore e por conseguinte as suas capacidades de defesa.

Sousa *et al.* (2007) referem algumas recomendações práticas a ter em atenção de modo a reduzir a vulnerabilidade das árvores aos ataques de agentes bióticos, tais como insectos e microrganismos. Assim, devem evitar-se as lavouras muito intensas, podas e descorticações excessivos dado que estes condicionam o estado fitossanitário das árvores e predispõem-nas às infecções.

Caetano (2007) acentua a importância da utilização de plantas sãs e micorrizadas, bem como a instalação das plantas em solos adequados, designadamente em solos supressivos.

A utilização de plantas micorrizadas é uma medida importante dado que as ectomicorizas, mais associadas às espécies florestais, conferem uma protecção às raízes através do “manto fúngico” (Alves, 2014; Caetano, 2007). O termo “micorriza” refere-se a uma associação simbiótica entre as raízes das plantas e certos fungos do solo e podem ser classificadas em ectomicorizas e endomicorizas conforme a colonização das hifas no que diz respeito ao tecido do hospedeiro. Os fungos micorrízicos, pertencentes às famílias Ascomiceta, Zigomiceta e Basidiomiceta, são heterotróficos e obtêm a energia necessária directamente do hospedeiro, em contrapartida, os fungos fornecem minerais inorgânicos provenientes do solo aos seus simbiontes (Henriques, 2009; Javaid, 2007).

As ectomicorizas estão mais associadas às espécies florestais e caracterizam-se pela presença de micélio na superfície da raiz (“manto fúngico”). Nestas associações, as hifas penetram os espaços intercelulares da camada superficial do córtex da raiz, de onde absorvem as substâncias necessárias ao seu metabolismo, formando uma estrutura labiríntica designada por rede de Harting

(Henriques, 2009; Javaid, 2007). Relativamente a estas associações, são cerca de 6000 espécies de fungos capazes de formar associações com as espécies florestais (Taylor, 2002).

Os solos supressivos são solos nos quais uma doença é suprimida ou está ausente (Chandrashekara *et al.*, 2012; Mazzola, 2002). A supressividade de um solo pode ser natural, quando é associada às propriedades físicas e químicas do solo independentemente do histórico cultural, ou induzida, a qual depende da presença de microrganismos antagonistas que poderão, posteriormente, ser adicionados aos solos a tratar. O grau de supressividade de um solo é influenciado pelas suas características físicas e químicas, designadamente pelo pH e pelos teores em matéria orgânica e em argila, os quais actuam ao nível da população microbiana do solo. Os mecanismos de supressividade associados à população microbiana podem incluir antibiose, competição, parasitismo e predação. Por sua vez, a acção supressiva de um solo pode ser geral para a maioria dos patogénios ou específica para um grupo de patogénios (Chandrashekara *et al.*, 2012).

Broadbent e Baker (1974) e Duvenhage (1991) identificaram solos com acção supressiva específica para *P. cinnamomi* e referem o seu papel no controlo deste patogénio. Estes solos apresentavam teores mais elevados de cálcio e magnésio de troca, azoto e matéria orgânica, o que conduziu a um número superior de microrganismos, designadamente de bactérias, actinomicetas e fungos, em comparação com os solos não supressivos, situação que induziu a lise das hifas e ainda a inibição da esporogénese (Malajczuk, 1983; Weste, 1983).

Caetano (2007) também menciona o uso de sobreiros e azinheiras tolerantes como uma medida preventiva, no entanto refere ainda que estas espécies, para além de apresentarem uma taxa de crescimento muito baixa, revelam uma ampla gama de respostas à infecção, o que aliado ao comportamento muito plástico e adaptável do patogénio torna muito difícil e moroso obter tais plantas. Tais constatações levam a crer que esta estratégia não será aplicável na prática a curto prazo (Tapias *et al.*, 2005, 2006).

As práticas culturais têm-se revelado de extrema importância para evitar a disseminação do inóculo e a consequente infestação de novas áreas. Nas zonas afectadas, quando o solo está molhado, é fulcral impedir o pastoreio já que os animais podem transportar inóculo para áreas não afectadas (Moricca *et al.*, 2016). É aconselhado a desinfecção do calçado, ferramentas, veículos e alfaias que entrem em contacto com o solo infestado. Deve ainda evitar-se movimentos de água de áreas infestadas para áreas não infestadas, já que os zoósporos de *P. cinnamomi*, esporos responsáveis pela infecção das raízes, se movem na água (Moricca *et al.*, 2016).

(2) As medidas de controlo nas áreas já infestadas para evitar a disseminação da doença assentam em práticas culturais e medidas de biocontrolo (incluindo a Alelopatia) de modo a mitigar a doença, podendo ainda, quando possível, recorrer ao controlo químico. Por outro lado, há que ter em conta que no sobcoberto existem espécies que são infectadas por *P. cinnamomi*, algumas assintomáticas, mas que constituem um reservatório de inóculo, pelo que a gestão das infestantes é fundamental (Moreira e Martins, 2005).

A solarização do solo é referida por alguns autores como uma possível medida de mitigação para inúmeros agentes patogénicos. Trata-se de um método físico que consiste no aproveitamento da energia solar através de um filme de plástico transparente, de espessura reduzida, que se coloca

sobre o solo, previamente humedecido, durante os meses mais quentes (Pinto e Morais, 1997). Palinhos (1994) demonstrou que a solarização reduz a densidade da população de *P. cinnamomi* no solo, considerando a medida adequada para ser aplicada em viveiros, antes da sementeira, no entanto Caetano (2007) argumenta que não será aplicável numa floresta já instalada.

O controlo químico, para além de ser dispendioso, tem-se mostrado infrutuoso devido à baixa eficácia dos fungicidas para *P. cinnamomi* bem como ao reduzido número de fungicidas no mercado, não evidenciando resultados positivos (Moreira, 2011).

Em Portugal, para controlo de *Phytophthora* spp. em sobreiro e azinheira, está apenas homologado o fosetil-AI (DGAV, 2001). É um fungicida sistémico da família dos organofosforados cujo princípio activo é o ião fosfonato (Coffey e Joseph, 1985). Embora o fosetil-AI seja sistémico com dupla translocação (no sentido do fluxo da transpiração -movimento acropetal e no floema - basipetal), apresenta uma baixa toxicidade *in vitro* para *P. cinnamomi*, não sendo eficaz na sua erradicação (Coelho, 2009). Todavia, Caetano (2007) considera eficaz o tratamento preventivo de plantas jovens de espécies lenhosas no momento da sua transplantação com fosetil-AI. As recomendações da DGAV (2001) incidem também no uso preventivo deste fungicida.

Dado que em Portugal só há uma única substância activa para controlar *P. cinnamomi*, põe-se o problema das resistências. Segundo Finlay e McCracken (1991), com o uso continuado de fungicidas sistémicos, as plantas desenvolvem resistência ao produto tornando, portanto, o controlo ainda mais difícil.

Actualmente, a Alelopatia é considerada como uma ferramenta importante para o biocontrolo de pragas, doenças e infestantes (Singh *et al.*, 2001).

O termo Alelopatia (alelo-: mútuo, -patia: sofrimento) foi inicialmente usado em 1937 por Hans Molisch (Caboun e John, 2015; Inderjit e Mukerji, 2006), no entanto, o conceito já havia sido descrito em 3000 a.C..

A Alelopatia é uma ciência multidisciplinar que estuda as interacções bioquímicas entre plantas e os restantes organismos de um ecossistema. Tais interacções são mediadas por metabolitos secundários, designados aleloquímicos, que são produzidos e libertados no ambiente (Macías *et al.*, 2007).

A planta liberta os aleloquímicos no ecossistema por lixiviação, volatilização, como exsudados radiculares e ainda durante a sua decomposição. Estes metabolitos vão ser absorvidos pelos organismos receptores, designadamente plantas, bactérias, fungos, entre outros, podendo ter uma acção benéfica ou prejudicial. A libertação dos aleloquímicos é influenciada pelo solo, condições climáticas e pela própria planta (Singh *et al.*, 2001) (Fig. 9).

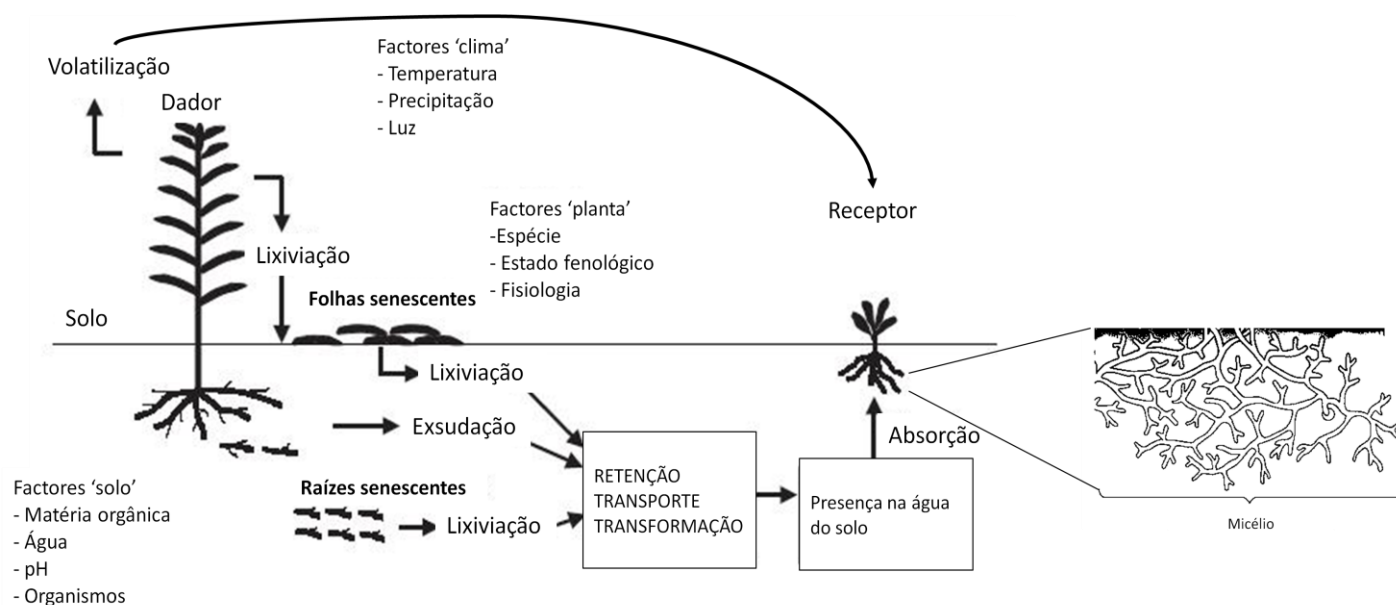


Figura 9 – Formas de libertação de aleloquímicos
(adaptado de: <http://pirun.kps.ku.ac.th/~g522710004/page2.html>)

A produção de metabolitos secundários com efeitos alelopáticos é muitas vezes resultado da resposta das plantas ao stress, actuando como mecanismos de defesa da planta contra factores bióticos ou abióticos adversos. Assim, a Alelopatia pode não se manifestar em todas as situações tais como em casos de competição em que a planta, por questões de sobrevivência, tem de investir a sua energia na produção de biomassa o que leva à diminuição da síntese de aleloquímicos (Scognamiglio *et al.*, 2013).

Devido à preocupação em diminuir o uso de pesticidas bem como ao baixo número de pesticidas sintéticos, eficazes e obtidos com baixo custo, os aleloquímicos tornam-se uma alternativa para serem usados na agricultura e silvicultura. Inúmeros autores assinalam a clara actividade dos aleloquímicos como reguladores de crescimento, herbicidas, insecticidas, fungicidas e outros produtos antimicrobianos, pelo que no futuro podem ser usados como um elemento na Protecção de Plantas (Cheng e Cheng, 2015; Tsuzuki e Dong, 2003).

De entre a flora mediterrânica, existem várias espécies com efeitos alelopáticos, como por exemplo as plantas aromáticas e medicinais (Araniti *et al.*, 2012), mas também muitas plantas das famílias Poaceae e Brassicaceae.

Existem inúmeros estudos (Neves *et al.*, 2014; Ríos *et al.*, 2016) sobre interacções entre plantas e microrganismos, designadamente entre plantas e fungos fitopatogénicos. No que se refere ao potencial alelopático de espécies da flora mediterrânica, *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Lavandula officinalis* (alfazema) são exemplos de referência. Widmer e Laurent (2006) conseguiram inibir a germinação de zoósporos de *Phytophthora capsici* Leonian, *P. megakarya* Brasier & M.J. Griffin e *P. palmivora* Butler em 100%, aplicando *in vitro* um extracto vegetal aquoso de rosmaninho e alecrim contendo 3 mg mL⁻¹ de ácido cafeico e 6 mg mL⁻¹ de ácido rosmanírico.

O efeito alelopático de extractos etanólicos de *Raphanus raphanistrum* L. em três fungos fitopatogénicos: *Botrytis cinerea* Pers., *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds e *Fusarium*

oxysporum Schlecht. emend. Snyder & Hansen também foi estudado *in vitro* por Sánchez-Leon *et al.* (2015), revelando que os extractos provenientes de frutos e sementes apresentavam um efeito inibitório para os três patógenos superior ao dos extractos provenientes das folhas e ramos devido a uma maior acumulação de metabolitos. Para além desta constatação, que evidencia que os órgãos usados na preparação dos extractos têm influência na acção sobre os fungos, os autores concluíram ainda que o estado fenológico da planta também tem influência na actividade do extracto.

As Poáceas também têm sido referidas em diversos trabalhos como tendo actividade alelopática (Sánchez-Moreiras *et al.*, 2003). Stapleton *et al.* (2001) verificaram o efeito inibitório de palhas secas de *Triticum aestivum* L. (trigo) e de *Hordeum vulgare* L. (cevada) incorporadas no solo na germinação de esclerotos de *Sclerotinia rolfsii* Sacc. e na redução de propágulos de *Pythium ultimum* Trow.

Os estudos sobre o efeito alelopático de espécies de plantas em *P. cinnamomi* são escassos. Castillo-Reyes *et al.* (2015) comprovaram o efeito inibitório dos extractos foliares das espécies de *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (chaparral), da família Zygophyllaceae e *Flourensia cernua* DC., da família Asteraceae, no crescimento micelial de *P. cinnamomi* na ordem dos 70%. No entanto, estas espécies não fazem parte da flora mediterrânica, sendo características da América do Norte e América Central. Os polifenóis foram as substâncias responsáveis pela actividade antifúngica de ambos os extractos.

O efeito do extracto de alho (*Allium sativum* L.) foi estudado *in vitro* por Sealy *et al.* (2007) em *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium oxysporum* Slecht, em várias espécies de *Pythium*, *Phytophthora cinnomomi* e *P. nicotianae* Breda de Haan,. Neste estudo, os autores provaram claramente a actividade fungicida do extracto já que na concentração de 10%, conseguiu inibir todos os patógenos. Estes resultados indicam que o extracto possui várias substâncias que actuam numa ampla gama de patógenos a uma baixa concentração.

Num estudo inovador, Neves *et al.* (2014), após verificarem que *Phlomis purpurea* L. não era infectada por *P. cinnamomi*, testaram *in vitro* e *in vivo* o efeito de extractos radiculares e foliares desta espécie no crescimento micelial bem como na produção e viabilidade das estruturas assexuadas de *P. cinnamomi*, verificando que os extractos, na concentração de 10 mg mL⁻¹ inibiram em 100% a actividade do patógeno. Também concluíram, que a planta *P. purpurea*, quando cultivada em conjunto com sobreiro e azinheira, exerceu uma função protectora contra a infecção e reduziu o inóculo no solo. Com base neste estudo, Neves (2014) identificou a substância phlomispurpentaolone, presente no extracto radicular, como sendo um possível responsável pela defesa da planta a *P. cinnamomi* bem como a substância responsável pela acção contra este patógeno. Embora esta planta exista na flora mediterrânica aparece sobretudo em solos calcários. A Alelopatia como método de biocontrolo pode ser posta em prática de diferentes formas: 1) *mulching*; 2) biofumigação; 3) biopesticidas; 4) pastagens melhoradas.

(1) *Mulching*

O *mulching* consiste na aplicação de uma camada de matéria orgânica na superfície do solo. Geralmente, o *mulching* é usado para melhorar a estrutura do solo, para manter a humidade e controlar as infestantes. Downer *et al.* (2001) verificaram que a aplicação de *mulches* de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) em solos naturalmente infestados com *P. cinnamomi* conduziu a um melhor

desenvolvimento do sistema radicular de abacateiro (*Persea americana* Mill.) e a uma diminuição do número de raízes infectadas, quando comparadas com as raízes em solo não tratado. Estes autores verificaram ainda a elevada actividade enzimática (celulase e laminarinase) a qual potenciou o efeito antagonista em *P. cinnamomi*.

(2) Biofumigação

A biofumigação é uma técnica de controlo biológico muito utilizada no combate a uma ampla gama de patógenos. A aplicação desta técnica no controlo de *P. cinnamomi* foi estudada por Dunne (2004) que apurou que *Brassica juncea* L. (mostarda-castanha), quando aplicada como biofumigante, exerce um efeito protector sobre plantas de *Lupinus angustifolius* L. (tremoceiro-de-folhas-estreitas), reduzindo a incidência da doença em 25%. Este autor também verificou que *B. juncea*, *in vitro*, reduz significativamente a produção de esporângios bem como o crescimento micelial, apesar de não exercer qualquer efeito na produção de clamidósporos.

Também Ríos *et al.* (2016) testaram, em condições laboratoriais e *in vivo*, o efeito de três espécies da família Brassicaceae biofumigantes no controlo de *P. cinnamomi* em *Lupinus luteus*, designadamente *Brassica carinata* A. Braun (mostarda-da-abissínia), *B. juncea* (mostarda-castanha) e *B. napus* L. (colza). Neste trabalho, concluíram que, apesar de *B. juncea* e *B. napus* inibirem o crescimento micelial, a produção de esporângios bem como a viabilidade dos clamidósporos, apenas *B. carinata* actuou na redução dos sintomas de doença nas plantas de tremocilha. No seguimento deste estudo, os autores avaliaram o potencial biofumigante de 14 espécies de Brassicáceas também em *P. cinnamomi*, em condições experimentais. Todas as espécies ricas em siringina inibiram em 100% o crescimento micelial, ao passo que as espécies ricas em glucosinolatos alifáticos ou aromáticos tiveram um efeito supressivo muito baixo ou nulo. De entre todas as espécies, os autores consideraram *B. juncea* a mais eficaz já que inibiu significativamente a viabilidade dos clamidósporos após 1 dia da biofumigação, comparativamente com os solos não tratados. No entanto, esta espécie não evitou a infecção das raízes de *L. luteus*.

Assim, os autores apontam a biofumigação com Brassicáceas, ricas em siringina (glucosinolato), como uma ferramenta potencial no biocontrolo de *P. cinnamomi*. No entanto, esta medida deve ser incorporada num controlo integrado da doença dado que por si só, não consegue ser suficientemente eficaz na supressão do inóculo de *P. cinnamomi*.

(3) Biopesticidas

Os biopesticidas são produtos de protecção de plantas que contêm agentes de controlo biológico, designadamente microrganismos, feromonas, extractos de plantas. Segundo Unsworth (2010), os biopesticidas podem ser categorizados em: pesticidas microbianos, cuja substância activa é um microrganismo como por exemplo bactérias, fungos ou vírus e pesticidas bioquímicos que consistem em substâncias que ocorrem naturalmente no ecossistema, tais como feromonas. Os aleloquímicos também podem ser integrados nesta categoria, mas apesar de haver inúmeros estudos sobre estas substâncias, apenas existe um número muito reduzido de produtos comercializáveis, como por exemplo um herbicida comercializado na Alemanha cuja substância activa é o ácido hidroxâmico (benzoxazinonas) produzido por gramíneas (Rodrigues, 2013).

(4) Pastagens melhoradas

A implementação e manutenção de pastagens tem tido como principal objectivo a melhoria da fertilidade do solo, combate à erosão e manutenção do encabeçamento, mas não com o objectivo de controlar problemas radiculares. Esta abordagem não tem sido referida na bibliografia. É uma componente inovadora da gestão dos Montados como estratégia de mitigação do declínio.

Desta forma, o controlo dos patógenos do solo e em particular de *P. cinnamomi* deve ser feito, numa primeira abordagem, a nível preventivo, integrando as diversas medidas. Deve-se seguir uma abordagem holística, não recorrendo apenas a uma medida mas sim à interligação sustentável das estratégias de gestão integrada, isto é, meios de luta integrados, com particular ênfase na luta biológica e cultural (ICNF, 2015). Assim, é necessário apostar na “implementação de medidas que minimizem o desenvolvimento de *P. cinnamomi* bem como o risco de infecção” e em práticas culturais que favorecem o bom estado fitossanitário e a “boa vegetação das árvores, na melhoria dos solos e na gestão florestal sustentável em termos económicos, ambientais e sociais” (Moreira, 2011). Como tal, o estudo dos potenciais efeitos alelopáticos de espécies herbáceas mediterrânicas é fulcral para criar alternativas ao controlo de agentes patogénicos, designadamente fungos e outros organismos do solo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material biológico

Foram seleccionadas 12 espécies de plantas pertencentes às famílias Fabaceae, Poaceae, Brassicaceae e Lamiaceae. Correspondem a quatro espécies cultivadas e oito da flora mediterrânica associadas aos Montados (Quadro 3). De entre as espécies de leguminosas, estudaram-se duas variedades por cada espécie.

Quadro 3 – Táxons seleccionados para a preparação dos extractos aquosos radiculares utilizados nos ensaios *in vitro*

Família	Táxon	Código EPPO	Proveniência das sementes
Brassicaceae	<i>Brassica nigra</i> L.	BRSNI	Sintra, Lisboa
	<i>Eruca sativa</i> Mill.	ERUVE	Comercial
	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	RAPRA	Maфра, Lisboa
	<i>Sinapis arvensis</i> L.	SINAR	Maфра, Lisboa
Fabaceae	<i>Cicer arietinum</i> L. 'Desi'	CIEAR 'Desi'	Estação de Melhoramento Nacional de Elvas
	<i>Cicer arietinum</i> L. 'Kabuli'	CIEAR 'Kabuli'	Estação de Melhoramento Nacional de Elvas
	<i>Lupinus albus</i> L.	LUPAL	Comercial (Casa Galvão)
	<i>Lupinus albus</i> L. 'Estoril'	LUPAL 'Estoril'	Estação de Melhoramento Nacional de Elvas
	<i>Lupinus luteus</i> L.	LUPLU	Comercial (Casa Galvão)
	<i>Lupinus luteus</i> L. 'Cardiga'	LUPLU 'Cardiga'	Estação de Melhoramento Nacional de Elvas
Lamiaceae	<i>Phlomis purpurea</i> L.	PLMPU	Loulé, Algarve
Poaceae	<i>Hordeum murinum</i> L.	HORMU	Maфра, Lisboa
	<i>Brachypodium distachyon</i> (L.) P.Beauv.	BRCDI	Sintra, Lisboa
	<i>Hordeum murinum</i> L.	HORMU	Maфра, Lisboa
	<i>Lolium rigidum</i> Gaud.	LOLRI	Comercial (Casa Galvão)
	<i>Secale cereale</i> L.	SECCE	Comercial (Casa Galvão)

A selecção das espécies a utilizar na avaliação da susceptibilidade a *P. cinnamomi* e na preparação de extractos aquosos radiculares (EARs) foi feita com base em estudos prévios e com base nas espécies usadas nas pastagens nos Montados (Araniti *et al.*, 2012; Belo *et al.*, 2009; Scognamiglio *et al.*, 2013).

Em primeiro lugar, seleccionaram-se três espécies de Fabáceas, designadamente *L. luteus*, *L. albus* e *C. arietinum*. As Fabáceas, dado a sua consociação com *Rhizobium*, são espécies preferenciais nas pastagens já que melhoram a fertilidade do solo. *L. luteus* e *L. albus* foram seleccionadas visto que são referidas na bibliografia como sendo hospedeiras de *P. cinnamomi*, contudo *L. luteus* é apontada como a espécie mais susceptível e na qual a severidade da doença é superior, pelo que foi utilizada como planta indicadora da actividade de *P. cinnamomi*. Por outro lado, esta espécie também aumenta o inóculo no solo, o que leva a um aumento da severidade do declínio em zonas de Montados. Contudo, a bibliografia acerca da interacção entre *L. albus* e *P. cinnamomi* é escassa (Serrano *et al.*, 2010; 2011). Para estas duas espécies, testaram-se duas cultivares, uma

cultivar comercial (sem designação, comercializada pela empresa Galvão) e outra cultivar melhorada pela Estação de Melhoramento Nacional de Elvas (*L. luteus* 'Cardiga' e *L. albus* 'Estoril'). Também se seleccionaram duas variedades de *C. arietinum* ('Kabuli' e 'Desi'), provenientes do mesmo local, visto serem leguminosas cultivadas no Alentejo tolerantes a condições de seca e pelo seu potencial alelopático (Bajwa *et al.*, 2006).

As espécies da família Brassicaceae são bem características das paisagens dos Montados e olivais alentejanos (Saavedra e Pastor, 1994). Para este trabalho, optou-se pelas espécies *S. arvensis*, *R. raphanistrum*, *E. sativa* e *B. nigra* devido aos ensaios já realizados. Na verdade, já se comprovou a presença de metabolitos secundários em Brassicáceas com actividade antifúngica e antibacteriana, tais como os glucosinolatos e os seus derivados (isotiociatanos) bem como as fitoalexinas (Sánchez-Leon *et al.*, 2015).

As Poáceas são muito utilizadas no Montado como componentes de pastagens e têm um potencial alelopático conhecido, pelo que as espécies seleccionadas visaram estes critérios. (Oliver *et al.*, 1999; Stapleton *et al.*, 2010). *L. rigidum* é usualmente incorporado nas pastagens dos Montados e tem propriedades alelopáticas herbicidas (Amini *et al.*, 2009; San Emeterio *et al.*, 2004). *B. distachyon* também é incorporado nas pastagens e é apontado por vários autores como uma planta modelo para as gramíneas, tornando-se uma “plataforma alternativa para investigar mecanismos moleculares de virulências do patógeno bem como de resistência das plantas a doenças” (Kouzai *et al.*, 2016). *H. murinum* está presente em terrenos pouco férteis, pelo que pode ser integrada em pastagens ou forragens em locais que outras espécies não vingariam (Giles, 1984). Também se optou por seleccionar a espécie *S. cereale* dado a sua elevada actividade alelopática herbicida (Farooq *et al.*, 2011), apesar do seu “habitat” não ser compatível com o Montado.

Por fim, *P. purpurea*, da família das Lamiáceas, foi escolhida devido aos resultados obtidos por Neves *et al.* (2014) num trabalho pioneiro em que testaram os extractos foliares e radiculares desta espécie no crescimento micelial, na produção de esporângios, libertação e germinação de zoósporos bem como na produção e viabilidade de clamidósporos.

Nos testes de patogenicidade não se testaram as espécies *R. raphanistrum* e *L. albus* 'Estoril' dado a indisponibilidade de sementes para esse efeito. *P. purpurea* também não foi testada por já ter sido comprovado por Neves *et al.* (2014) que não é hospedeiro de *P. cinnamomi*. No cultivo de plantas para a obtenção de extractos, não se semeou *R. raphanistrum*, *B. distachyon* e *P. purpurea* por já existir biomassa radicular proveniente de ensaios anteriores.

Os isolamentos de *P. cinnamomi* utilizados nos diversos ensaios foram provenientes da colecção de trabalho do INIAV, estando no Quadro 4 identificada a sua proveniência. Os isolamentos foram mantidos em placas (90 mm de Ø¹) de PDA (Anexo 2.1), incubadas a 25°C, no escuro. Para ter culturas jovens mas com bom desenvolvimento micelial, os isolamentos foram usados após 12 dias da incubação.

¹ Ø - diâmetro

Quadro 4 – Proveniência dos isolamentos testados e ensaios nos quais foram utilizados

Isolamento	Material	Local	Data	Ensaio
Pc 886	Sobreiro	Alentejo	Maio, 2015	Testes de patogenicidade
Pc 1538	Solo	Miranda do Corvo, Coimbra	Maio, 2015	Testes de patogenicidade
Pc 1539	Solo	Miranda do Corvo, Coimbra	Maio, 2015	Testes de patogenicidade; Efeito dos EAR no crescimento micelial
Pc 5833	Castanheiro	Penela da Beira, Viseu	Novembro, 2015	Testes de patogenicidade; Efeito dos EAR na produção de estruturas assexuadas e germinação dos zoósporos

EARs – extractos aquosos radiculares

O solo utilizado nos ensaios *in vivo* foi adquirido pelo INIAV e está caracterizado no Quadro 5 (Laboratório de Solos do INIAV). As dimensões dos elementos das estruturas utilizadas para a análise textural estão apresentadas no Anexo 1.

Quadro 5 – Classificação do solo utilizado nos testes de patogenicidade (AG – areia grossa; AF – areia fina; L – limo; A – argila; MO – matéria orgânica)

Classificação textural					Classificação mineral e orgânica					
AG (%)	AF (%)	L (%)	A (%)	Textura	K ₂ O (*mg/kg)	K (*mg/kg)	P ₂ O ₅ (*mg/kg)	P (*mg/kg)	MO (g/kg)	N Orgânico (g/kg)
68,2	16,6	5,7	5,5	Areno-franca	41	34	25	11	27,8	0,3
n.a.- Não aplicável; *- mg / Kg (Égner Riehm)					Muito baixo		Baixo		Médio	n.a.

2.1.1 Cultivo das espécies de plantas seleccionadas para a obtenção de raízes

As raízes para a posterior preparação dos extractos foram obtidas a partir das plantas indicadas no Quadro 3, que foram cultivadas durante 44 dias.

Uma semana antes do estabelecimento do ensaio, as sementes foram submetidas a uma estratificação pelo frio, a 7°C, de modo a quebrar a dormência e a facilitar a germinação.

Para as gramíneas, prepararam-se duas placas de Petri por espécie. Colocou-se algodão com papel de filtro em toda a área da placa de Petri (150 mm de Ø) e pipetou-se 25 mL de KNO₃ (0,2%). Em cada placa, colocaram-se 50 sementes, perfazendo um total de 100 sementes por espécie. As placas foram seladas com parafilm® e colocadas no frigorífico.

Para as Brassicáceas, pesou-se 2 g de sementes de cada uma das espécies, as quais foram transferidas para copos de precipitação de 50 mL de volume. A cada copo de precipitação, adicionou-se 10 mL de KNO₃ (0,2%). Os copos de precipitação foram também selados com parafilm® e colocados no frigorífico por 7 dias.

Por cada espécie, prepararam-se 20 vasos de plástico. Relativamente às Poáceas e Fabáceas, semearam-se 5 sementes por vaso, para as Brassicáceas, semearam-se 15 sementes por vaso.

Ao fim dos 44 dias (fim do ensaio) procedeu-se à lavagem das raízes. Contaram-se as plantas e determinou-se o peso de folhas e de raízes. As raízes de cada espécie foram colocadas em sacos fechados, identificadas e congeladas até à preparação dos extractos.

2.2 Preparação dos extractos aquosos radiculares (EARs)

A metodologia utilizada na preparação dos EARs foi adaptada de AlKhail (2005) e de López *et al.* (2011).

Utilizaram-se 10 g de raízes por espécie de planta. As raízes foram maceradas com areia purificada num almofariz à qual se foi adicionando 100 mL de água destilada a 80°C até a obtenção de uma massa pastosa. O preparado foi dividido em 3 tubos Falcon (50 mL de volume) e estes foram colocados num copo de precipitação com a água a 80°C durante 15 minutos de modo a inactivar enzimas. Seguidamente, e após tarar os tubos estes foram a centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon que foram armazenados no congelador.

O extracto de *P. purpurea* foi preparado de acordo com a metodologia acima modificada, devido às raízes mais lenhosas. As raízes (10 g) foram trituradas num moinho e depois maceradas com azoto líquido. A massa pastosa das raízes e a água foi seguidamente transferida para tubos Falcon e submetida a 100°C durante 10 minutos. Após tarar os tubos, estes foram a centrifugar nas mesmas condições dos anteriores (10000 rpm, durante 10 minutos).

A determinação do peso seco de cada extracto foi feita através da secagem, a 60°C durante 48 horas, de uma amostra de 1 mL de cada extracto aquoso. O pH foi determinado numa amostra de 2 mL de cada EAR.

2.3 Ensaios *in vitro* para avaliação do efeito de extractos aquosos radiculares (EARs) nas estruturas de *Phytophthora cinamomi*

2.3.1 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) no crescimento micelial

Foram preparadas placas com a cultura Pc 1539 para inóculo do ensaio de crescimento micelial. O ensaio constou de três modalidades (concentrações de EARs): C0-controlo, C1-50% e C2-75% e 4 repetições nas modalidades C1 e C2 e 12 repetições na modalidade C0.

Prepararam-se 8 placas de Petri (60 mm de Ø) por espécie de planta, 4 para a C1 e 4 para a C2. Nas placas referentes à C1 foram adicionados 6 mL de EAR a testar e 6 mL de meio de V8 líquido (Anexo 2.2); na C2 foram pipetados 9 mL de EAR e 3 mL de meio de V8 líquido por placa. Para evitar contaminações, os extractos foram filtrados e esterilizados através de filtros estéreis (0,2 µm) para seringas. No controlo (C0), utilizaram-se 6 placas por concentração sendo que o volume dos EARs foi substituído por água destilada e esterilizada. Cada placa foi inoculada com um disco de micélio com 5 mm de Ø, selada com parafilm® e colocada a incubar a 25°C, no escuro, durante 12 dias.

A avaliação da fitotoxidade dos EARs de cada espécie no crescimento micelial de *P. cinamomi* foi determinada pelo peso seco do micélio formado após 12 dias do início do ensaio. O micélio de cada placa foi removido do meio, retirou-se o excesso de líquido, e foi colocado em papel

de alumínio previamente tarado e seco durante 48 horas a 60°C. Após o período indicado, registou-se o peso seco.

2.3.2 Efeito dos extractos radiculares aquosos (EARs) na produção de esporângios, formação e libertação de zoósporos

Inicialmente foi estabelecido um ensaio preliminar onde se avaliou o desempenho de 4 isolamentos de *P. cinnamomi* (Quadro 4) na produção de esporângios, com adaptação do método referido em Chee e Newhook (1965) e Tuset *et al.* (2001).

Para haver um desenvolvimento micelial prévio, colocou-se um disco de 5 mm de Ø de micélio retirado da margem de colónias jovens de cada isolamento (12 dias de crescimento em meio de PDA) por cada placa de Petri (60 mm de Ø) com 10 mL de meio de V8 líquido. Após 8 dias, o micélio desenvolvido foi passado por papel de filtro para retirar o excesso de meio e colocado numa placa com 10 mL de suspensão de solo não estéril (Anexo 3). Prepararam-se 4 repetições por isolamento e as placas foram mantidas à temperatura ambiente (cerca de 20°C), protegidas da luz solar directa, durante 6 dias. Após este período observou-se a formação de diferentes quantidades de esporângios conforme o isolamento. O isolamento Pc 5833 foi o selecionado para ser utilizado nos ensaios que se seguiram por ter sido o que produziu maior número destas estruturas.

Na avaliação do efeito dos EARs na produção de esporângios utilizou-se o procedimento acima descrito com o isolamento Pc 5388 (Fig. 10).



Figura 10 – Crescimento do isolamento Pc 5833 em meio de V8 líquido, após 8 dias de incubação a 25°C, no escuro

O efeito dos EARs na produção de esporângios e libertação de zoósporos, foi avaliado apenas na concentração C2 usando 3 placas por EAR / espécie de planta, no controlo (C0) utilizaram-se 12 placas.

Para a avaliação da inibição dos EARs na produção de esporângios e na capacidade de formação de zoósporos, foram adicionados 7,5 mL de cada extracto de planta e 2,5 mL da suspensão de solo por placa de Petri (60 mm de Ø). Uma semana após a incubação das placas em condições de temperatura e luz adequadas (acima referidas), os esporângios foram quantificados, em cada placa, numa área de 1 mm². Devido às diferenças evidentes nas dimensões das estruturas

observadas, mediu-se² o comprimento e a largura dos esporângios formados nos diferentes EARs e no controlo.

Para induzir a libertação de zoósporos, o micélio foi cuidadosamente removido, lavado com água destilada estéril e colocado em 10 mL de água destilada estéril a 9°C (no frigorífico) durante 45 minutos.

Após este período, as placas de Petri foram retiradas do frigorífico e deixadas em repouso cerca de 20 minutos, à temperatura ambiente, até se iniciar a libertação dos zoósporos. De cada placa de Petri transferiu-se 10 mL da água onde se encontravam os zoósporos em movimento para tubos Falcon, os quais foram agitados até imobilizar os esporos. A concentração de zoósporos foi quantificada com o auxílio de um hemacitómetro.

2.3.3 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na germinação dos zoósporos

i) Germinação de zoósporos em meio PARPH, libertados de esporângios formados na presença de extractos

Para conhecer a viabilidade dos zoósporos formados a partir de esporângios produzidos em placas que continham os extractos (provenientes de 2.3.2) foram inoculadas placas de Petri (90 mm de Ø) (uma por cada EAR) que continham meio PARPH (Anexo 2.3), com 0,5 mL da suspensão de zoósporos obtida após a libertação destes esporos em água destilada estéril. Após a incubação durante 24 horas, no escuro e a 25 °C, contabilizou-se o número de zoósporos germinados provenientes de cada extracto.

ii) Germinação de zoósporos na presença de extractos, libertados de esporângios produzidos em condições normais

De modo a averiguar qual o efeito dos extractos na germinação dos zoósporos produzidos em condições normais, preparou-se previamente meio de V8 sólido com 5% de agar que foi plaqueado numa concentração de 25% (2,5 mL / placa), ao qual se adicionaram 7,5 mL (75%) de cada EAR. Testaram-se 16 extractos com 3 repetições / extracto. Nas placas utilizadas para controlo, o volume dos EARs, foi substituído por água destilada estéril.

Antes de se adicionar os extractos ao meio de V8 sólido, estes foram aquecidos até aos 35°C em banho-maria, para facilitar a homogeneização com o meio. Seguidamente as placas foram colocadas no frio (11°C) cobertas com papel de alumínio para prevenir a fotodegradação, até solidificarem.

Os zoósporos utilizados neste ensaio foram provenientes das 12 placas de controlo do ensaio anteriormente descrito (2.3.3 i). Para cada placa, pipetou-se 0,5 mL da uma suspensão de esporos (410 000 zoósporos / mL) que foi distribuída homogeneamente, recorrendo a uma ansa estéril. As placas foram seladas com parafilm® e colocadas a incubar a 25°C, no escuro. Após 24 horas, ao microscópio, contou-se o número de zoósporos germinados a partir das colónias obtidas.

² As medições foram efectuadas utilizando o software OLYMPUS DP Soft e a câmara OLYMPUS DP20.

2.3.4 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de clamidósporos

A avaliação do efeito dos extractos na produção destes esporos foi efectuada a partir da metodologia acima descrita (2.3.2), tendo sido realizada em simultâneo com a avaliação do efeito dos extractos na produção de esporângios. Assim, o número de clamidósporos produzidos foi medido (diâmetro) e contabilizado, em cada placa de Petri, numa área de micélio de 1 mm², calculando-se também as percentagens de inibição.

2.3.5 Cálculo do efeito de inibição dos extractos aquosos radiculares (EARs) no crescimento micelial e nas estruturas do patógeno

A percentagem de inibição da actividade de *P. cinnamomi* foi calculada da seguinte forma:

$$\text{INIB}(\%) = 100 \times \frac{C - T}{C}$$

Para o crescimento micelial (%INIB_{cm}) (ensaio referido em 2.3.1), o valor de C = peso seco do micélio de *P. cinnamomi* produzido no controlo e T = peso seco do micélio produzido nos diferentes EARs, após 12 dias de incubação a 25°C, no escuro.

Relativamente à produção de esporângios (%INIB_e) (ensaio apresentado em 2.3.2), C = número médio de esporângios / mm² de micélio, produzidos no controlo e T = número médio de esporângios / mm² de micélio, produzidos nos diferentes EARs, após 6 dias de incubação à temperatura ambiente (~20°C), sem luz directa.

Para a produção de clamidósporos (%INIB_c) (ensaio apresentado em 2.3.4), C = número médio de clamidósporos / mm² de micélio, produzidos no controlo e T = número médio de clamidósporos / mm² de micélio, produzidos nos diferentes EARs, após 6 dias de incubação à temperatura ambiente (~20°C), sem luz directa.

No cálculo da percentagem de inibição da formação e libertação dos zoósporos (%INIB_f), C = número de zoósporos formados no controlo e T = número de zoósporos formados em cada EAR. Para a percentagem de inibição da germinação de zoósporos (%INIB_v) libertados de esporângios formados em presença dos EARs (2.3.3-i), C = % de zoósporos germinados no controlo e T = % de zoósporos germinados em cada EAR após 24 horas de incubação a 25°C, no escuro. Do mesmo modo, para a inibição da germinação dos zoósporos em meio de V8 sólido combinado com os EARs (%INIB_g), (2.3.3-ii), C = número de zoósporos germinados no controlo e T = número de zoósporos germinados em cada EAR, após 24 horas de incubação a 25°C, no escuro.

2.4 Testes de patogenicidade

2.4.1 Preparação do inóculo

Na preparação do inóculo, utilizaram-se sementes de millet (*Panicum milliaceum*) que serviram como substracto para *P. cinnamomi*.

Preparou-se 2440 g de millet distribuídos por balões de Erlenmeyer, de 250 mL e 500 mL com cerca de 20 g e 50 g, respectivamente por cada balão. Adicionou-se água destilada com cerca do dobro do volume das sementes a todos os balões, e deixou-se repousar durante a noite. Seguidamente retirou-se o excesso de água e os balões foram a autoclavar a 121°C durante 20

minutos. Os balões foram autoclavados mais 2 vezes com 24 horas de intervalo. Antes da última autoclavagem, adicionou-se 80 mL de meio de V8 líquido / balão a metade dos balões (para inocular) e nos restantes adicionou-se o mesmo volume de água destilada (controlo). Três dias depois os balões foram inoculados.

Os isolamentos de *P. cinnamomi* selecionados para a preparação do inóculo estão identificados no Quadro 4. Estes foram colocados a crescer em meio de PDA em placas de Petri de 90 mm de Ø, durante 12 dias, no escuro e a 25°C (Fig. 11).

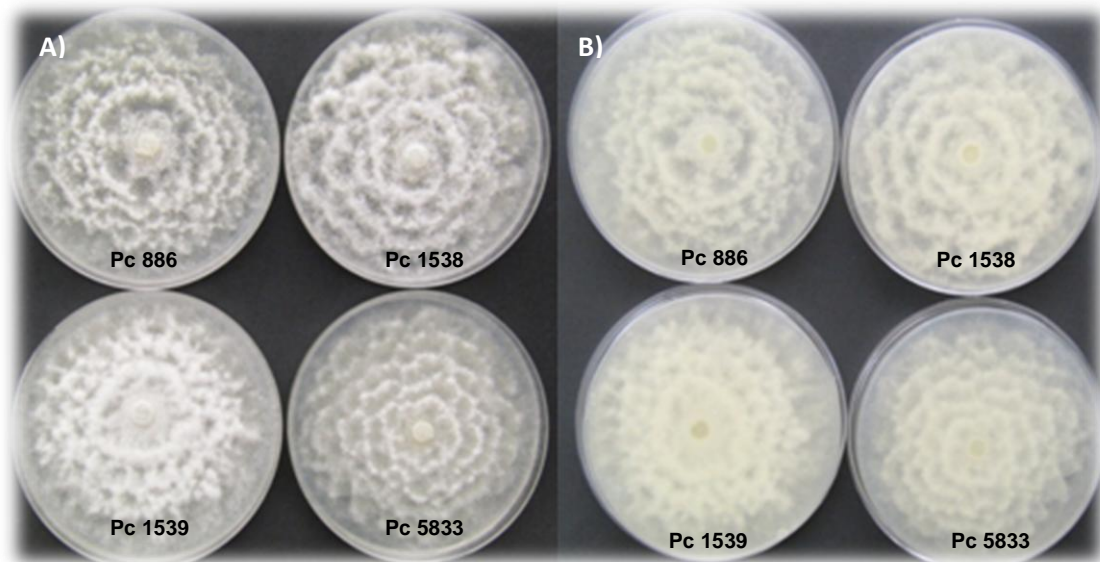


Figura 11 – Isolamentos de *Phytophthora cinnamomi* utilizados na preparação do inóculo para a infestação artificial do solo, em meio de PDA, ao fim de 12 dias de incubação a 25°C (A- face superior; B- face inferior)

Após o período de incubação, em condições de assepsia, cortaram-se discos de micélio com 5 mm de Ø da zona periférica das placas para inocular o millet. Adicionou-se água esterilizada aos balões, de modo a manter a humidade, na proporção de 10 mL de água destilada por 100 g de millet. Seguidamente, os balões foram colocados a incubar a 25 °C, no escuro (Fig. 12).

Passadas 3 semanas, procedeu-se à inoculação dos vasos do ensaio a estabelecer.



Figura 12 – Balões de Erlenmyer com o inóculo

2.4.2 Estabelecimento dos ensaios de patogenicidade em estufa

Os ensaios de patogenicidade decorreram na estufa de experimentação do INIAV (Oeiras), tendo uma duração de cerca de 2 meses.

Avaliou-se a susceptibilidade a *P.cinnamomi* das espécies de Fabáceas, Poáceas e Brassicáceas apresentadas em 2.1, cultivadas durante 67 dias.

As sementes das espécies a utilizar foram previamente sujeitas a uma estratificação pelo frio, descrita em 2.1.1.

Antes da inoculação do solo, o millet foi retirado dos balões de Erlenmeyer, colocado em tabuleiros desinfetados com etanol (96%), tendo sido, de seguida, homogeneizado. Este procedimento foi iniciado com o millet para controlo para evitar qualquer contaminação (Fig. 13).



Figura 13 – Tabuleiros com millet inoculado e não inoculado com *Phytophthora cinnamomi*

Cada vaso foi cheio até 2/3 com solo (caracterizado no Quadro 5) ao qual se adicionaram 25 g de millet inoculado (solo infestado) (Fig. 14) ou sem inóculo (controlo), cobrindo-se de novo com solo. De seguida, todos os vasos foram regados. Utilizaram-se 10 vasos por espécie cultivada: 5 vasos com solo infestado e 5 vasos com solo não infestado (controlo),

Na sementeira de gramíneas colocou-se 5 sementes por vaso e nas Brassicáceas, semearam-se 15 sementes por vaso dispostas em 3 filas de 5 sementes.



Figura 14 – Vaso com millet inoculado com *Phytophthora cinnamomi*

Terminado o ensaio, as plantas foram removidas dos vasos e as raízes foram lavadas. Colheram-se amostras de raízes de cada espécie para avaliar a presença de *P. cinnamomi* as quais foram mantidas em placas com água destilada a 12°C até serem plaqueadas. Em cada planta, a raiz foi separada da parte aérea, seguidamente foram pesadas e colocadas numa estufa a 82°C durante 48 horas. Decorrido esse período as plantas foram pesadas, calculando-se o peso seco médio por planta.

Contabilizou-se ainda o número de plantas obtidas no solo infestado e no solo não infestado.

Para o isolamento de *P. cinnamomi*, as raízes foram cortadas em troços com cerca de 5 mm de comprimento que foram desinfetados numa solução de hipoclorito de sódio (1,5%) durante 2 minutos. Decorrido o tempo indicado, as raízes cortadas foram passadas por água destilada, retirou-se o excesso de água com papel de filtro de 90 mm de Ø (Whatman®) e foram distribuídas por placas de Petri (90 mm de Ø) (5 repetições por espécie) que continham meio selectivo PARPH. As placas foram a incubar a 25°C, no escuro, durante 2 a 8 dias.

Colheram-se amostras do solo infestado para determinar o número de propágulos de *P.cinnamomi* presentes. Para esta avaliação, utilizou-se uma suspensão de cada um dos solos a testar preparada com 10 g de solo aos quais se adicionou 100 mL de agar de água (0,2%) (Anexo 2.4). As suspensões foram colocadas a agitar durante 2 horas e seguidamente deixadas em repouso durante a noite. No dia seguinte, pipetou-se 1 mL de cada suspensão para uma placa de Petri (90 mm de Ø) com meio PARPH e espalhou-se uniformemente com uma hansa. Prepararam-se 6 repetições por cada solo. As placas foram a incubar a 25°C, no escuro. Após 24 horas, as placas foram lavadas em água corrente para eliminar o excesso de agar e colocadas novamente a 25°C. O número de colónias foi contado nas 48 horas seguintes.

O número de propágulos por grama de solo (PRP/g) foi calculado através da seguinte equação: $PRP/g = 10 \times \frac{Col.}{r}$ onde Col. = número de colónias contabilizados na totalidade das placas e r = número de repetições.

2.5 Análise estatística dos resultados

Na análise estatística, devido à grande variabilidade apresentada nos ensaios, os valores das percentagens de inibição do crescimento micelial, da produção de esporângios e de clamidósporos foram transformados. A transformação utilizada foi a seguinte:

$$INIBt = \frac{100 - \%INIB}{100}$$

Onde:

- INIBt – valor da % de inibição transformado;
- %INIB – percentagem de inibição.

A análise de variância (ANOVA) da percentagem de inibição do crescimento analisou os dados em função da espécie, da concentração e ainda a interação entre as duas variáveis. Na comparação das médias utilizou-se o teste de Tukey para $\alpha=0,05$. As análises de variância (ANOVA) das percentagens de inibição da produção de esporângios e de clamidósporos analisaram os dados obtidos apenas com uma concentração (C2). A comparação das médias das percentagens de inibição obtidas na produção de esporângios e na de clamidósporos também foi feita recorrendo ao teste de Tukey, com nível de significância $\alpha=0,05$.

A análise estatística foi feita utilizando o software R 3.3.2

3. RESULTADOS

3.1 Cultivo das espécies seleccionadas para a preparação de extractos aquosos radiculares (EARs)

Após o período de cultivo das plantas, determinou-se a percentagem de plantas obtidas tendo em conta o número de sementes colocado inicialmente.

O número de plantas para preparação dos EARs variou bastante com a espécie. Nas Brassicáceas a percentagem de plantas com bom desenvolvimento foi muito baixa, designadamente nas espécies de *E. sativa* e *S. arvensis* que atingiram valores de 24,4% e 12,7%, respectivamente. Contudo, na *B. nigra* alcançou-se um número satisfatório de plantas, com 57,8% de germinação. Nas variedades de *C. arietinum*, 'Kabuli' e 'Desi', conseguiu-se obter uma percentagem de plantas de 91 e 92% respectivamente. Comparando a percentagem de germinação e o desenvolvimento entre as variedades melhoradas e as comerciais das espécies de *L. albus* e *L. luteus*, verificou-se que houve diferenças. Relativamente às Poáceas, o número de plantas obtidos também foi satisfatório (Fig. 15).

O baixo sucesso de algumas sementeiras pode ser devido à sua baixa capacidade germinativa que não foi inicialmente testada.

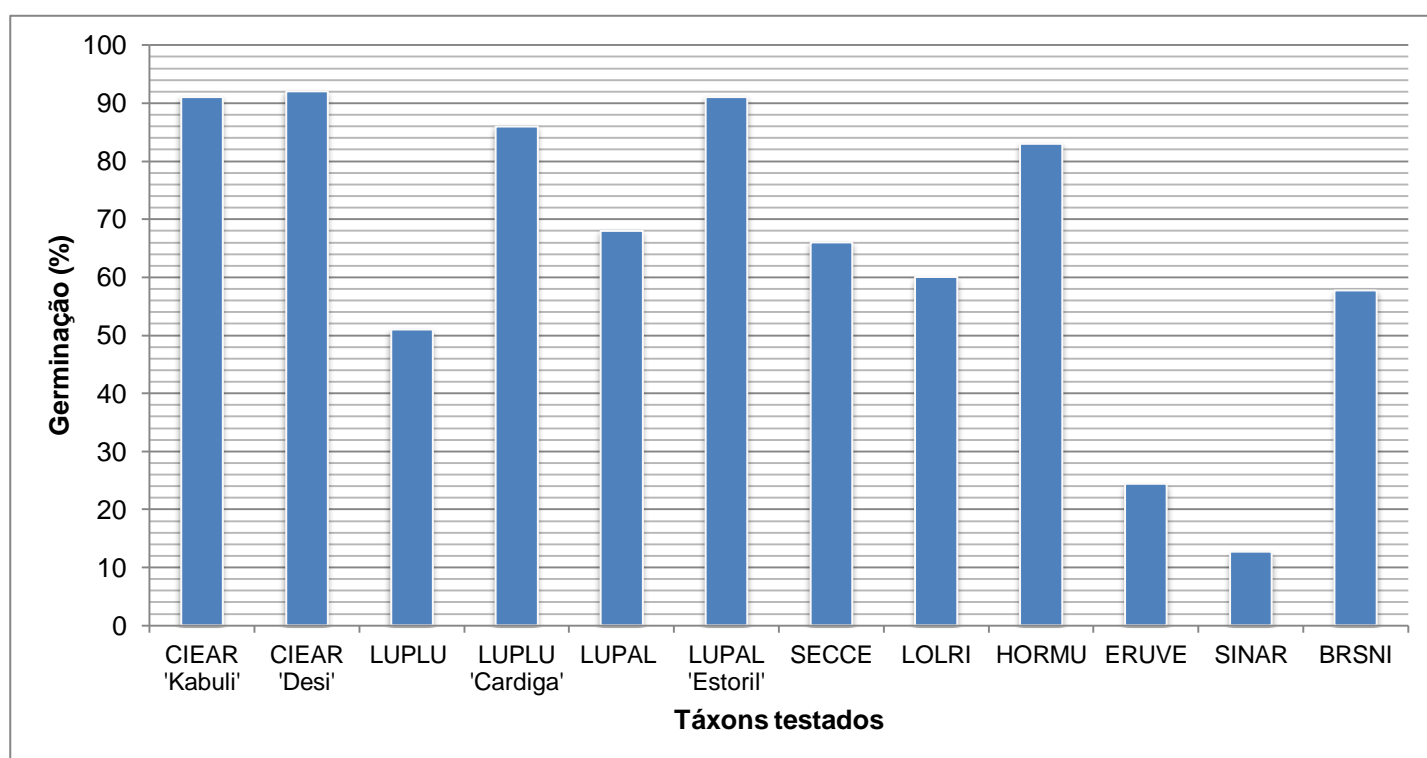


Figura 15 – Germinação dos táxons seleccionados para a preparação de extractos aquosos radiculares (EARs)

A observação visual dos sistemas radiculares das diferentes espécies permitiu detectar claras diferenças. As Poáceas e, especialmente as Brassicáceas, designadamente as plantas de *E. sativa*, apresentaram sistemas radiculares muito reduzidos e as poucas raízes desenvolvidas eram pequenas e quebradiças. Por outro lado, os sistemas radiculares das Fabáceas eram consistentes e bem desenvolvidos, podendo ser observados vários nódulos radiculares. No entanto, todas as

plantas foram utilizadas na preparação dos extractos. Na Fig. 16 pode-se observar o sistema radicular de *L. albus* com nódulos radiculares bem presentes.



Figura 16 – Aspecto do sistema radicular de *Lupinus albus*

3.2 Avaliação dos extractos aquosos radiculares (EARs)

Os EARs obtidos a partir das plantas de *S. cereale*, *L. rigidum* e *L. luteus* apresentaram concentrações baixas, de 2,4 2,2 e 4,7 mg/mL respectivamente, quando comparados com os outros extractos. O extracto cuja concentração foi a mais elevada foi o de *L. albus* com 29,58 mg/mL, sendo de apontar também os valores acima de 25,5 mg/mL dos extractos de ambas as variedades de *L. luteus*, de *C. arietinum* 'Desi', *S. arvensis* e *P. purpurea* (Quadro 6).

Os valores de pH dos extractos, apresentados no Quadro 6, variaram entre 5,63 e 7,21, não se registando nenhum valor extremo de acidez ou de alcalinidade. Os EARs de *R. raphanistrum* e das variedades comerciais de *L. albus* e *L. luteus* foram os que registaram os valores mais baixos, entre 5,63 e 5,83. Por sua vez, o pH dos EARs das variedades melhoradas, destas duas últimas espécies, apresentaram valores ligeiramente superiores, 5,94 e 6,03, para *L. luteus* 'Cardiga' e *L. albus* 'Estoril', respectivamente. Nas Brassicáceas, os valores observados foram os mais elevados: 7,01, 7,21 e 7,23 para os EAR de *E. sativa*, *B. nigra* e *S. arvensis*, respectivamente, enquanto que o extracto de *R. raphanistrum*, tal como já referido, apresentou um valor mais baixo. O extracto combinado de *E. sativa* + *R. raphanistrum* (EARc) apresentou um valor de pH de 7,05. O pH dos EARs das gramíneas variou entre 6,2 e 6,78.

Quadro 6 – Caracterização dos extractos aquosos radiculares (EARs) (mg/mL)

Táxon	Peso seco (mg/mL)	pH
BRSNI	22,72	6,57
ERUVE	19,24	7,04
RAPRA	16,68	5,83
SINAR	28,60	7,21
ERUVE+RAPRA	20,00	7,05
CIEAR 'Kabuli'	18,34	6,13
CIEAR 'Desi'	26,76	6,01
LUPLU	3,74	5,63
LUPLU 'Cardiga'	27,80	5,94
LUPAL	29,58	5,63
LUPAL 'Estoril'	20,88	6,03
PLMPU	25,50	6,35
BRCDI	16,54	6,60
HORMU	21,42	6,28
LOLRI	1,70	6,78
SECCE	1,90	6,39

3.3 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) no crescimento micelial

O efeito dos EARs no crescimento micelial foi avaliado ao fim de 12 dias de incubação.

Na análise de variância, não se analisaram os dados obtidos com os extractos de *L. rigidum* e de *E.sativa* + *R. raphanistrum* por se ter apenas testado a concentração de 75%. Nesta análise os valores de F são muito significativos, observando-se que existem diferenças significativas entre as espécies e entre as concentrações (Quadro 7). Estes resultados indicam que a concentração dos extractos e a espécie de planta originária afectam significativamente a actividade micelial do patógeno como é possível verificar pelos valores apresentados nos Quadros 8 e 9. Verificou-se ainda que a interacção dos factores 'concentração' e 'espécie' também afecta a inibição do crescimento micelial.

Quadro 7 – Resumo da análise da variância da de inibição no crescimento micelial (variável transformada – INIBt_{cm})

Origem da variação	GL	SQ	QM	F(calc)	Pr(>F)
Concentração	1	6017	6017	4,998	0,0281 *
Espécie	14	274498	19607	16,286	<2×10 ⁻¹⁶ *
Concentração×Espécie	14	38080	2720	2,259	0,0117 *
Resíduos	82	98719	1204	-	-

*α= 0,05

Nos Quadros 8 e 9 apresentam-se a análise do efeito inibitório dos EARs no crescimento micelial na C1 e na C2 respectivamente. Os valores da comparação das médias de inibição do crescimento micelial foram previamente transformados (capítulo 2.5 – Análise estatística).

Na concentração C1 (50%), a observação das placas mostrou um bom desenvolvimento do micélio, denso e compacto, no entanto, nas placas com extracto de *E. sativa*, o micélio era vestigial e bastante difuso. Ao comparar as médias dos pesos secos do micélio obtido nos diferentes EARs, verificou-se que a maioria apresentava um valor superior a 11,85 mg, valor correspondente ao peso seco do micélio obtido no controlo. A excepção foi verificada apenas nas placas que tinham adicionados os EARs de *S. arvensis*, *E. sativa* e *R. raphanistrum*, os quais apresentaram valores inferiores a 11,25 mg, revelando uma actividade inibitória destes extractos.

Verificou-se que, para esta concentração, foi o extracto de *L. albus* que permitiu um crescimento micelial superior em cerca de 81%, tendo uma actividade significativamente diferente de alguns extractos, designadamente de *S. cereale*, *B. distachyon* e os extractos que inibiram o crescimento do micélio. Por outro lado, foi o extracto de *E. sativa* que mais inibiu o crescimento do micélio, apresentando uma percentagem de inibição de 69,83%, que se mostrou significativamente diferente de todos os extractos à excepção de *S. arvensis* e *R. raphanistrum*, extractos que também inibiram o patogénio em 5,06 e 20,25% respectivamente (Quadro 8).

Quadro 8 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na C1 (50%) no crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi*

Táxon	Peso seco (mg)		%INIB _{cm1} *	INIB _{tcm1} **	Tukey***
	M ⁱ⁾	DP ⁱⁱ⁾			
Controlo	11,85	0,49	n.a.	n.a.	n.a.
LUPAL	21,45	4,41	-81,01	1,80	a
PLMPU	20,18	0,44	-70,25	1,703	ab
HORMU	18,20	4,62	-53,59	1,54	ac
LUPLU	17,43	0,68	-47,05	1,47	acd
CIEAR D	17,08	2,87	-44,09	1,44	acd
LUPAL E	16,63	0,78	-40,30	1,32	acd
CIEAR K	15,65	1,35	-33,07	1,24	acd
BRSNI	15,38	0,39	-29,75	1,30	acd
LUPLU C	15,38	2,25	-29,11	1,30	acd
SECCE	13,03	1,31	-9,92	1,10	bcd
BRCDI	12,50	3,05	-5,49	1,05	bcd
SINAR	11,25	0,51	5,06	0,95	ce
RAPRA	9,45	8,50	20,25	0,80	de
ERUVE	3,58	0,54	69,83	0,30	e

i) – M – valor médio do peso seco do micélio; ii) – DP – desvio padrão do peso seco do micélio; * - %INIB_{cm1} – percentagem de inibição do crescimento micelial na C1; ** - INIB_{tcm1} – variável transformada; *** - Valores seguidos pelas mesmas letras, por coluna, não são significativamente diferentes a $\alpha=0,05$; n.a. – não aplicável

Na C2 (75 %), verificou-se uma diminuição do desenvolvimento do micélio em presença de todos os extractos quando comparado com o micélio produzido na C0 (controlo) e na C1. Aqui, também o micélio produzido nas placas com adição de extracto de *Eruca sativa* era vestigial e nalgumas placas o crescimento foi totalmente inibido (Fig. 17). O valor mais baixo de peso seco foi obtido na C2 do EARc (*E. sativa* + *R. raphanistrum*), o que se traduziu numa inibição de 92,17%. O extracto de *P. purpurea* (C2) foi onde se observou um maior crescimento micelial, cerca de 170% quando comparado com o controlo.

A actividade de inibição foi observada com os extractos de *S. arvensis*, *R. raphanistrum*, *E. sativa* e no extracto combinado (EARc) destas duas espécies, que inibiram o crescimento micelial em 26,33%, 56,23%, 83,63% e 92,17% respectivamente. O EARc teve uma actividade significativamente diferente de todos os extractos que não inibiram o patógeno (Quadro 9).

Quadro 9 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na C2 (75%) no crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi*

Táxon	Peso seco (mg)		%INIB _{cm2} *	INIBt _{cm2} **	Tukey***
	M ⁱ⁾	DP ⁱⁱ⁾			
Controlo	7,03	0,10	n.a.	n.a.	n.a.
PLMPU	18,95	6,61	-169,75	2,70	a
LUPLU	14,55	4,31	-107,12	2,07	ab
CIEAR D	13,58	0,43	-93,24	1,93	ac
LUPAL	13,33	0,38	-89,68	1,90	ac
BRSNI	11,35	3,83	-61,57	1,62	bcd
CIEAR K	11,03	0,76	-56,94	1,57	bcd
LUPLU C	10,85	0,61	-54,45	1,54	bcd
LUPAL E	9,43	1,18	-34,16	1,34	bce
BRCDI	8,90	3,46	-26,69	1,27	bce
LOLRI	8,85	0,50	-25,98	1,26	bce
HORMU	8,30	3,74	-18,15	1,18	bce
SECCE	7,53	1,28	-7,12	1,07	cef
SINAR	5,18	1,26	26,33	0,74	deg
RAPRA	3,08	1,85	56,23	0,44	eg
ERUVE	1,15	0,84	83,63	0,16	fg
ERUVE+RAPRA	0,55	0,13	92,17	0,08	g

i) – M – valor médio do peso seco do micélio; ii) – DP – desvio padrão do peso seco do micélio; * - %INIB_{cm2} - percentagem de inibição do crescimento micelial na C2; ** - INIBt_{cm2} – variável transformada; ***-Valores seguidos pelas mesmas letras, por coluna, não são significativamente diferentes a $\alpha=0,05$; n.a. – não aplicável

Os extractos que inibiram o crescimento micelial de *P. cinnamomi* em ambas as concentrações foram os obtidos com plantas de *E. sativa* e de *R. raphanistrum* e com o combinado das duas espécies (*E. sativa* + *R. raphanistrum*). O extracto radicular de *Sinapis arvensis* também mostrou uma ligeira inibição (5,06% na C1 e 26% na C2). Os EARs obtidos a partir das restantes espécies conduziram a um aumento do desenvolvimento do micélio, sendo que foi o extracto de *P. purpurea* na C2 que mais potenciou o crescimento do micélio.

Na Figura 17, apresentam-se as placas da C2 com o micélio de *P. cinnamomi* desenvolvido em EARs de *P. purpurea*, de *R. raphanistrum*, de *E. sativa*. Apresenta-se ainda o micélio desenvolvido em meio de V8 líquido sem extractos (controlo). Na Figura 18, pode ainda observar-se as placas com o micélio desenvolvido no extracto combinado de *E. sativa* + *R. raphanistrum* (EARc) e as respectivas placas de controlo.

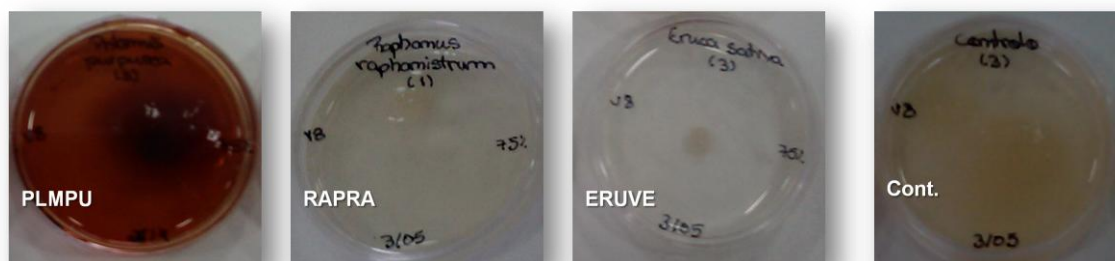


Figura 17 – Actividade dos extractos aquosos radiculares (EARs) de *Phlomis purpurea* (PLMPU), *Raphanus raphanistrum* (RAPRA), *Eruca sativa* (ERUVE), a 75% no crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* em meio de V8 líquido após 12 dias de incubação a 25°C e micélio desenvolvido no controlo (Cont.)

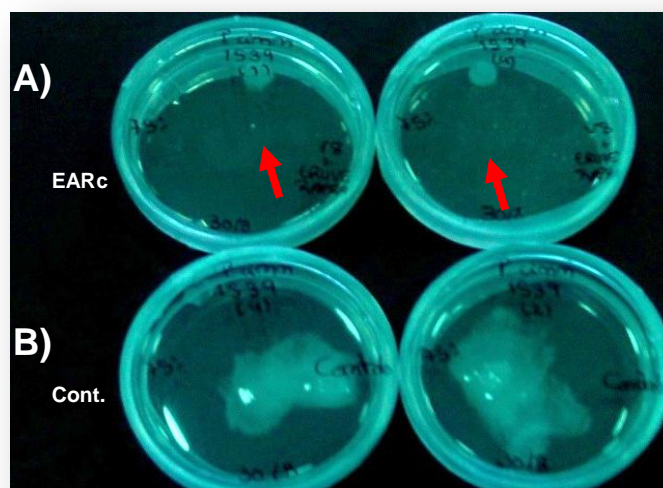


Figura 18 – Actividade do extracto radicular combinado (EARc) de *Eruca sativa* + *Raphanus raphanistrum* a 75% no crescimento micelial de *Phytophthora cinnamomi* em meio de V8 líquido após 12 dias de incubação a 25°C (A) e micélio de *P.cinnamomi* desenvolvido em meio de V8 líquido após 12 dias de incubação a 25°C (Cont.) (B)

3.4 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de esporângios, formação e libertação de zoósporos

Ao observar as estruturas no micélio formado na presença de EARs, foi possível constatar, numa primeira abordagem, que a produção de *hyphal swellings* foi muito reduzida no EAR de *E. sativa*, por outro lado EAR de *C. arietinum* 'Desi', permitiu um desenvolvimento de *hyphal swellings* muito acentuado em comparação com os restantes (Fig. 19).

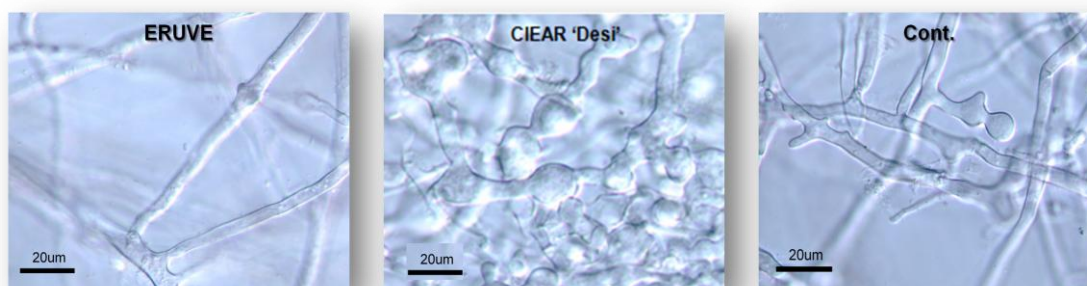


Figura 19 – Micélio formado em presença dos extractos aquosos radiculares (EARs) de *Eruca sativa* (ERUVE) e *Cicer arietinum* 'Desi' (CIEAR 'Desi') e no controlo

Ao fazer a análise de variância (Quadro 10), pode-se verificar que o valor de F é muito significativo, o que indica que o efeito dos EARs difere significativamente de acordo com a espécie de planta donde foi extraído, assumindo a hipótese de que o extracto aplicado influencia a produção de esporângios.

Quadro 10 – Resumo da análise da variância da inibição da produção de esporângios (variável transformada - INIBt_e)

Origem da variação	GL	SQ	QM	F(calc)	Pr(>F)
Espécie	15	1334,59	89,97	11,75	<0,001
Resíduos	32	242,21	7,57	-	-

* $\alpha = 0,05$

Após a análise dos resultados apresentados no Quadro 11, verifica-se elevada variabilidade, expressa pelo desvio padrão, do número de esporângios produzidos nas placas com um mesmo extracto.

O maior número médio de esporângios produzidos, de cerca de 84 esporângios / mm², ocorreu em presença do EAR de *L. rigidum* tendo sido o único extracto que induziu o desenvolvimento destas estruturas em número superior ao do controlo. Todos os outros extractos testados apresentaram efeito inibitório na esporogénese.

Na comparação de médias, foi possível integrar as espécies que inibiram em 100% a produção de esporângios, o que corresponde a um valor da variável transformada INIBt_e=0, num mesmo grupo já que as médias não são significativamente diferentes. Por outro lado, verificou-se que a percentagem de inibição do EAR de *L. rigidum* foi significativamente diferente de todas as outras já que foi o único a aumentar o número de esporângios produzidos em comparação com o controlo. No entanto, como este valor mostrou uma grande disparidade dos outros, todos os outros extractos foram considerados significativamente semelhantes, o que não estava de acordo com o observado. Por este motivo, decidiu-se repetir a análise, retirando os dois valores mais elevados (dos EARs de *L. rigidum* e de *S. cereale*), de modo a verificar se eram detectadas diferenças.

É de destacar também que os extractos de *L. luteus* e *L. luteus* 'Cardiga' inibiram a produção de esporângios em 92,86% e 96,43% (Quadro 11).

Na análise apresentada no Quadro 11 verificam-se algumas diferenças coincidentes com o observado. Os extractos que inibiram em 100% a produção de esporângios, designadamente os EARs de ambas as variedades de *C. arietinum* e de *L. albus*, os EARs de *E. sativa*, de *R. raphanistrum* e o EARc de *E. sativa* + *R. raphanistrum*, foram todos integrados num grupo homogéneo, por outro lado, o extracto de *B. distachyon* teve uma actividade significativamente diferente de todos os outros.

Quadro 11 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de esporângios de *Phytophthora cinnamomi* (comparação de médias sem os dados dos EARs de *Lolium rigidum* e *Secale cereale*)

Táxon	Esporângios / mm ²		%INIBe	INIBte	Tukey*
	M ⁱ⁾	DP ⁱⁱ⁾			
Controlo	38,62	8,70	n.a.	n.a.	n.a.
LOLRI	83,93	14,25	-117,32	2,17	n.a.
SECCE	28,44	34,55	26,37	0,74	n.a.
BRCDI	18,14	4,62	53,02	0,47	a
HORMU	7,22	4,30	81,32	0,19	b
SINAR	5,62	3,84	85,44	0,15	bc
BRSNI	5,09	4,13	86,81	0,13	bc
LUPLU	2,76	1,02	92,86	0,01	bc
LUPLU 'Cardiga'	1,38	0,49	96,43	0,04	cd
CIEAR 'Desi'	0,00	0,00	100,00	0,00	c
CIEAR 'Kabuli'	0,00	0,00	100,00	0,00	c
ERUVE	0,00	0,00	100,00	0,00	c
ERUVE+RAPRA	0,00	0,00	100,00	0,00	c
LUPAL 'Estoril'	0,00	0,00	100,00	0,00	c
LUPAL	0,00	0,00	100,00	0,00	c
PLMPU	0,00	0,00	100,00	0,00	c
RAPRA	0,00	0,00	100,00	0,00	c

i) – M – valor médio do número de esporângios produzidos / mm²; ii) – DP – desvio padrão do número de esporângios produzidos / mm²; * - %INIB_e percentagem de inibição da produção de esporângios; ** - INIB_t_e – variável transformada; ***-Valores seguidos pelas mesmas letras, por coluna, não são significativamente diferentes a $\alpha=0,05$; n.a. – não aplicável

Devido às diferenças observadas nas dimensões dos esporângios, procedeu-se à sua medição.

Os esporângios de maiores dimensões foram produzidos em extracto de *S. arvensis*., mas os extractos das Poáceas também deram origem a esporângios maiores do que os do controlo, com excepção de *S. cereale*. Por outro lado, ao comparar os esporângios produzidos nos EARs de ambas as variedades de *L. luteus*, notou-se uma diferença significativa, sendo que os produzidos em EAR de *L. luteus* apresentavam maiores dimensões, de cerca do dobro das dimensões dos esporângios produzidos em EAR de *L. luteus* 'Cardiga', registando-se neste extracto os valores mínimos tanto de comprimento como de largura do esporo. O comprimento médio e a largura média dos esporângios de *L. luteus* 'Cardiga' apresentaram uma redução de 45% e 41% respectivamente, em comparação com o controlo (Quadro 12).

No entanto, a relação entre o comprimento e a largura dos esporos (Cm/Lm) foi semelhante nos diversos extractos e variou entre 1,4 e 1,6.

Quadro 12 – Dimensões (μm) médias dos esporângios produzidos em presença de extractos aquosos radiculares (EARs) e sem extracto (controlo)

Táxon	M*		DP**		Cm/Lm ⁱⁱⁱ⁾	Máx. ^{***}		Mín. ^{****}	
	C ⁱ⁾	L ⁱⁱ⁾	C	L		C	L	C	L
Controlo	38,4	24,7	7,5	4,1	1,6	54,5	33,2	22,7	16,7
SINAR	47,0	30,1	9,9	6,1	1,6	61,7	69,0	18,7	14,7
LUPLU	44,1	26,9	10,0	5,0	1,6	64,7	43,2	26,4	20,1
HORMU	42,1	26,2	9,6	5,2	1,6	61,1	36,3	19,5	12,0
BRCDI	40,2	27,8	8,5	6,6	1,4	52,3	42,5	21,1	15,1
LOLRI	37,2	26,5	7,2	4,8	1,4	52,7	37,4	25,6	19,3
BRSNI	34,1	21,7	10,5	5,7	1,6	49,1	29,9	14,9	11,4
SECCE	32,0	22,9	6,4	3,2	1,4	46,9	29,7	19,6	15,8
LUPLU 'Cardiga'	21,2	14,8	8,7	4,7	1,4	35,3	20,3	11,9	8,3

; **** - Min. – valor mínimo observado; i) – C – comprimento; ii) – L- largura; iii) – Cm/Lm – razão comprimento médio / largura média

Nas placas com o extracto de *Lolium rigidum* houve uma elevada produção de esporângios como se havia referido, o que conduziu a um número bastante elevado de zoósporos (425 000 zoósporos / mL), ligeiramente superior ao obtido nas placas de controlo. Este foi o único extracto a não inibir nem a produção de esporângios nem a formação de zoósporos. Dos restantes EARs, é de destacar *B. nigra* e *S. cereale*, cujas inibições foram de 70,12% e 81,71 % respectivamente (Quadro 13).

O extracto que mais inibiu a formação de zoósporos, em 90,24%, foi o de *S. arvensis*. Neste caso, embora se tenham observado esporângios de elevadas dimensões, o número de zoósporos libertados foi muito reduzido, na ordem dos 40 000 zoósporos / mL, e bastante inferior quando comparado com os dos outros extractos (Quadro 13).

Quadro 13 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na formação e libertação de zoósporos de *Phytophthora cinnamomi*

Táxon	Zoósporos / mL *	%INIBf**
Controlo	410 000	n.a.
LOLRI	425 000	-3,66
LUPLU	345 000	15,85
HORMU	325 000	20,73
LUPLU 'Cardiga'	295 000	28,05
BRCDI	175 000	57,32
BRSNI	122 500	70,12
SECCE	75 000	81,71
SINAR	40 000	90,24

* - Número de zoósporos formados a partir de esporângios produzidos na presença de EARs / mL de suspensão; **%INIBf – percentagem de inibição da formação de zoósporos formados a partir de esporângios produzidos em presença de EARs ; n.a. – não aplicável

3.5 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na germinação dos zoósporos

i) Germinação de zoósporos em meio PARPH, libertados a partir de esporângios formados na presença de extractos

Testou-se a viabilidade dos zoósporos libertados a partir de esporângios produzidos em presença dos extractos das plantas indicadas no Quadro 12.

O teste da viabilidade dos esporos (zoósporos) foi observado em meio PARPH e mostrou que os zoósporos formados em presença do EAR de *L. rigidum* (Fig. 20) eram extremamente viáveis quando comparados com os zoósporos produzidos no controlo, tendo uma taxa de germinação de 8,82%. Os zoósporos formados em presença do EAR de *B. distachyon* também apresentaram uma taxa de germinação superior ao controlo, de 1,47%. Assim, estes dois EARs foram os únicos a promover a viabilidade dos zoósporos. É ainda de apontar que o extracto de *Lolium rigidum* foi o único a promover a produção de esporângios, a formação de zoósporos bem como a sua viabilidade. Os zoósporos formados nos outros extractos revelaram uma baixa percentagem de germinação com taxas de inibição elevadas, com excepção para o extracto de *S. cereale* onde foi observada uma ligeira inibição (14%). Os zoósporos produzidos em presença do extracto de *Sinapis arvensis* estavam totalmente inviáveis, o que foi reflectido pela taxa de germinação de 0% (Quadro 14).

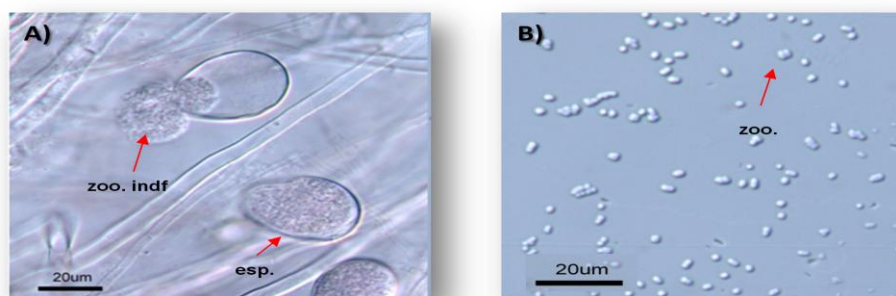


Figura 20 – Esporângios (esp.) produzidos em extracto radicular aquoso (EAR) de *Lolium rigidum* a libertar uma massa de zoósporos indiferenciada (zoo. indf) e zoósporos respectivos (zoo.) em água destilada estéril

Quadro 14 – Germinação (%) de zoósporos de *Phytophthora cinnamomi* em meio PARPH, formados e libertados a partir de esporângios produzidos em presença dos extractos aquosos radiculares (EARs)

Táxon	Zoósporos germinados (%)	%INIBv*
Controlo	1,34	n.a.
LOLRI	8,82	-582,70
BRCDI	1,47	-9,97
SECCE	1,14	14,73
HORMU	0,14	89,89
BRSNI	0,06	94,39
LUPLU	0,02	98,61
LUPLU 'Cardiga'	0,01	99,65
SINAR	0,00	100,00

* - %INIBv – percentagem de inibição da germinação dos zoósporos formados a partir de esporângios produzidos em presença de EARs por comparação com os libertados de esporângios produzidos em meio sem EARs; n.a.- não aplicável

ii) Germinação de zoósporos na presença de extractos, libertados a partir de esporângios produzidos em condições normais

Os extractos de *S. cereale* e de *B. distachyon* inibiram a germinação dos zoósporos em 64,24% e 59,18% respectivamente. O EAR de *E. sativa* e o EARc de *E. sativa* + *R. raphanistrum* inibiram em 100% a germinação destes esporos, por sua vez, o EAR de *R. raphanistrum* também inibiu em cerca de 99% a germinação destes esporos.

Nas placas com os restantes extractos, o número de zoósporos germinados era muito elevado (>110), o que revela que estes EARs não apresentaram qualquer actividade inibitória na germinação. Nas placas com extracto de *L. rigidum* (Fig. 21) observou-se também um número elevado de zoósporos germinados (Quadro 15), o que está em conformidade com os resultados obtidos nos vários ensaios, que vêm mostrando, que ao contrário de inibir a actividade do patógeno, o extracto desta planta pode contribuir para aumentar a sua actividade.

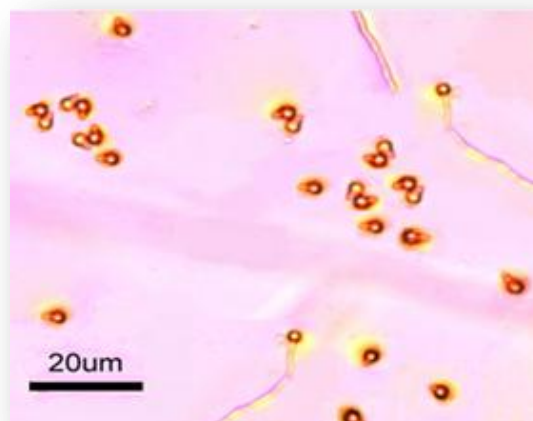


Figura 21 – Zoósporos germinados (zoo. germ) em presença de extracto de *Lolium rigidum* (C2-75%) e em meio de V8 sólido (25%) após 24 horas de incubação a 25°C, no escuro

Quadro 15 – Germinação de zoósporos de *Phytophthora cinnamomi* em meio de V8 sólido com 75% de extractos aquosos radiculares (EARs), formados em condições normais

Táxon	Zoósporos germinados / mL	%INIBg*
Controlo	105,33	n.a.
CIEAR 'Kabuli'	>110	<0
CIEAR 'Desi'	>110	<0
LUPLU	>110	<0
LUPLU 'Cardiga'	>110	<0
LUPAL	>110	<0
LUPAL 'Estoril'	>110	<0
LOLRI	>110	<0
HORMU	>110	<0
SINAR	>110	<0
BRSNI	>110	<0
PLMPU	>110	<0
BRCDI	43,00	59,18
SECCE	37,67	64,24
RAPRA	0,67	99,36
ERUVE	0,00	100,00
ERUVE+RAPRA	0,00	100,00

* - %INIBg – percentagem de inibição dos zoósporos em meio de V8 sólido (25%) e EAR (75%) por comparação com os germinados em meio de V8 sólido (25%) e água destilada estéril (75%); n.a. – não aplicável

3.6 Efeito dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de clamidósporos

Na produção de clamidósporos, a análise de variância (Quadro 16), mostra um F significativo para as espécies de plantas, o que indica que existem diferenças significativas entre o efeito dos extractos na produção de clamidósporos, dado que varia de acordo com a espécie de planta de onde foi preparado.

Quadro 16 – Resumo da análise da variância da percentagem de inibição na produção de clamidósporos (variável transformada – INIBt_c)

Origem da variação	GL	SQ	QM	F(calc)	Pr(>F)
Espécies	15	1812,813	120,85	3,067	0,0038
Resíduos	32	1260,89	39,40	-	-

* $\alpha = 0,05$

Tal como para os esporângios, notou-se uma grande variedade de clamidósporos produzidos, especialmente nas placas com o EAR de *S. arvensis*, o que resulta em desvios padrão bastante elevados e próximos do valor médio.

Ao comparar as médias das inibições (variável transformada) apresentadas no Quadro 17, foi possível verificar que os extractos que inibiram totalmente a produção de clamidósporos (*C. arietinum* 'Desi', *C. arietinum* 'Kabuli', *E. sativa* e *E. sativa* + *R. raphanistrum*) diferem significativamente do EAR de *H. murinum*, que foi onde se formou o maior número de clamidósporos. Todos os restantes EARs, à excepção do extracto de *R. raphanistrum* no qual se registou um número médio de clamidósporos produzidos igual ao do controlo (1,38 clamidósporos / mm²), aumentaram a produção destes esporos em mais de 100%.

As actividades dos extractos das variedades comerciais de *L. albus* e *L. luteus* mostraram-se semelhantes, pelo que também foram agrupados, no entanto, nas variedades melhoradas de ambas as espécies, a produção de clamidósporos foi superior, em comparação com o número observado nas comerciais.

Quadro 17 – Actividade inibitória dos extractos aquosos radiculares (EARs) na produção de clamidósporos de *Phytophthora cinnamomi*

Táxon	Clamidósporos / mm ²		%INIB _c *	INIB _t **	Tukey***
	M ⁱ⁾	DP ⁱⁱ⁾			
Controlo	1,38	0,49	n.a.	n.a.	n.a.
HORMU	28,97	6,27	-1999,06	20,991	a
SINAR	22,71	27,19	-1545,42	16,454	ab
BRCDI	18,36	12,12	-1230,17	13,302	ab
LUPLU 'Cardiga'	13,90	9,21	-907,24	10,072	ab
LOLRI	12,31	6,37	-791,91	8,919	ab
PLMPU	11,99	8,92	-768,84	8,688	ab
LUPAL 'Estoril'	10,50	5,52	-661,20	7,612	ab
LUPLU	7,22	4,14	-422,84	5,228	ab
SECCE	7,22	1,33	-422,84	5,228	ab
LUPAL	6,90	4,11	-399,78	4,998	ab
BRSNI	2,86	0,55	-107,60	2,076	ab
RAPRA	1,38	1,86	0,00	1	b
CIEAR 'Desi'	0,00	0,00	100,00	0,00	b
CIEAR 'Kabuli'	0,00	0,00	100,00	0,00	b
ERUVE	0,00	0,00	100,00	0,00	b
ERUVE+RAPRA	0,00	0,00	100,00	0,00	b

i) – M – valor médio do número de clamidósporos produzidos / mm²; ii) – DP – desvio padrão do número de clamidósporos produzidos / mm²; * - %INIB_c percentagem de inibição da produção de clamidósporos; ** - INIB_t – variável transformada; ***-Valores seguidos pelas mesmas letras, por coluna, não são significativamente diferentes a $\alpha=0,05$; n.a. – não aplicável

Após a medição dos clamidósporos, verificou-se que os produzidos no extracto de *S. arvensis* apresentaram dimensões ligeiramente superiores aos produzidos no controlo e em presença dos outros extractos. Os clamidósporos produzidos nos extractos de *L. rigidum*, de ambas as variedades de *L. albus*, de *P. purpurea* e de *H. murinum* foram dos esporos com menores dimensões, com um diâmetro inferior a 28,4 μm , no entanto foi no EAR de *B. nigra* que se registou o menor valor, de 18,4 μm , o que representa cerca de 48% do tamanho dos clamidósporos produzidos no controlo (35,3 μm) (Quadro 18).

Quadro 18 – Dimensões (μm) médias dos clamidósporos produzidos em presença de extractos aquosos radiculares (EARs) e em condições óptimas (controlo)

Táxon	M*	DP**	Máx.***	Mín.****
Controlo	35,3	6,9	47,67	18,42
BRSNI	18,4	2,6	22,63	14,02
LUPAL	22,0	4,4	30,44	14,3
LUPAL 'Estoril'	23,0	6,5	33,91	10,85
PLMPU	25,7	3,1	32,5	16,39
HORMU	28,0	6,5	41,42	15,37
LOLRI	28,4	7,7	44,85	15,85
SECCE	31,2	9,4	50,6	12,59
LUPLU	32,5	4,9	40,73	21,68
BRCDI	34,0	6,9	46,26	18,53
RAPRA	35,1	8,8	48,64	19,93
LUPLU 'Cardiga'	36,0	7,1	46,95	17,33
SINAR	38,4	9,0	58,28	20,26

* - M – valor médio do diâmetro do esporo; ** - DP – desvio padrão;
 *** - Máx. – valor máximo observado; **** - Min. – valor mínimo observado

3.6 Testes de patogenicidade

Nas Fabáceas testadas pode-se verificar que as plantas de *C. arietinum* 'Kabuli' e 'Desi', bem como as de *L. albus* cultivadas em solo infestado não apresentaram quaisquer sintomas de doença na parte aérea. Os folíolos apresentaram uma cor verde forte sem cloroses ou descolorações. No sistema radicular também não se detectou visualmente quaisquer lesões ou necroses. Nas Fig. 22 e 23 podem-se observar plantas de *C. arietinum* 'Kabuli' e *L. albus* com os respectivos sistemas radiculares. Verificou-se a presença de nódulos radiculares em ambas as variedades, bem desenvolvidos e activos pois, quando sujeitos a corte, apresentavam uma coloração rosada, o que indica a sua viabilidade, isto é, mesmo na presença do patógeno estas espécies conseguem manter consociações com *Rhizobium*.

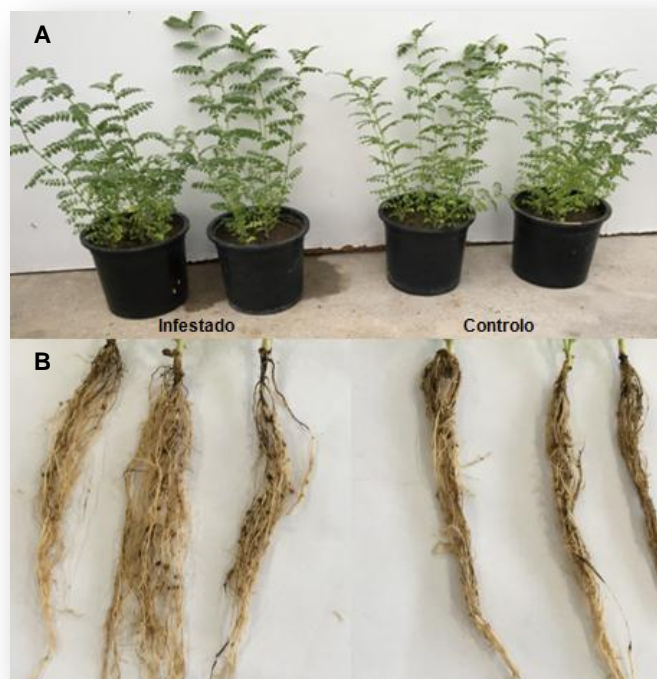


Figura 22 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de *Cicer arietinum* 'Kabuli' cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado *Phytophthora cinnamomi*



Figura 23 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de *Lupinus albus* cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado *Phytophthora cinnamomi*

Relativamente a *L. luteus*, indicada como uma espécie muito susceptível, verificou-se que para ambas as cultivares testadas, as plantas cultivadas em solo infestado apresentavam sintomas de clorose e necrose foliares. Já as plantas cultivadas em solo não infestado, isto é, no controlo,

mantiveram um aspecto saudável (Fig. 24 e 25). A nível do sistema radicular, nas plantas cultivadas em solo infestado foi possível observar necroses ao longo de todo o seu comprimento bem como na zona do colo. Ambas as variedades apresentavam um número de nódulos radiculares muito inferior ao das outras Fabáceas e, quando cortados, apesar de alguns nódulos apresentarem uma coloração rosada muito ligeira, a maioria não apresentava qualquer coloração.

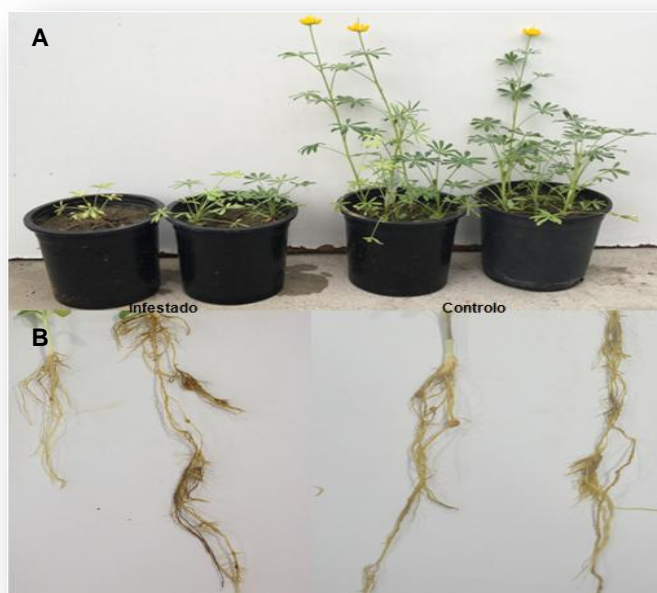


Figura 24 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de *Lupinus luteus* cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado *Phytophthora cinnamomi*



Figura 25 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de *Lupinus luteus* 'Cardiga' cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado *Phytophthora cinnamomi*

Nas gramíneas, as plantas cultivadas em solo infestado apresentaram a parte aérea mais susceptível à acama e as folhas com uma coloração de verde mais claro, comparativamente às que se encontravam em solo não infestado. Foi ainda observado um maior afilamento nas plantas do solo infestado, o que se pode traduzir numa estratégia de sobrevivência. Por sua vez, as raízes das plantas, em ambos os tratamentos (solo infestado e não infestado) não apresentaram quaisquer necroses. Na Fig. 26 é possível observar plantas inteiras de *S. cereale* e o seu respectivo sistema radicular.

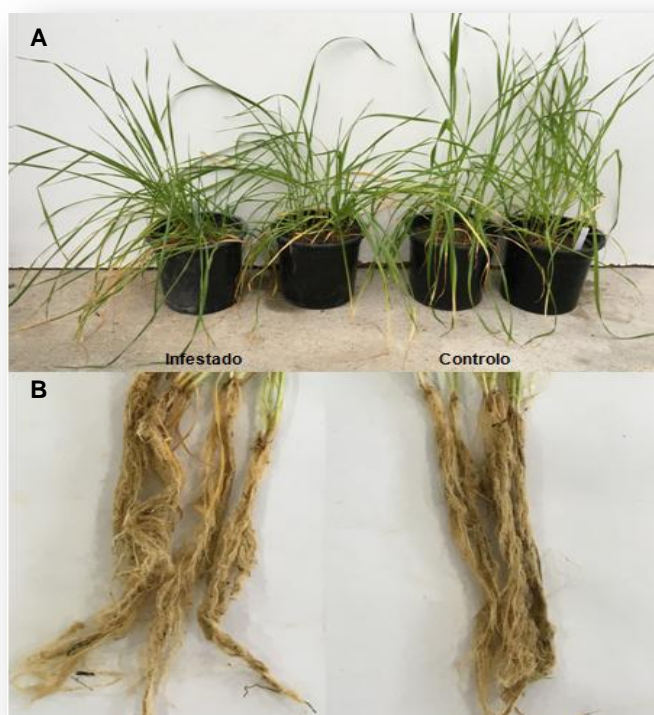


Figura 26 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de *Secale cereale* cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado *Phytophthora cinnamomi*

Nas Brassicáceas, verificou-se que as plantas cultivadas em solo infestado não apresentavam quaisquer clorose ou descolorações na parte aérea, no entanto, a floração ocorreu mais cedo do que nas plantas do controlo. O sistema radicular era curto, fino e quebradiço, não apresentando quaisquer lesões ou necroses, como se pode observar na Fig. 27 em plantas de *E. sativa*, cujo sistema radicular era, visualmente, o menos desenvolvido.



Figura 27 – Plantas (A) e sistema radicular (B) de *Eruca sativa* cultivadas durante 67 dias em solo infestado e não infestado *Phytophthora cinnamomi*

Em geral, a sobrevivência (%) (Fig. 28) observada foi superior nas plantas cultivadas nos vasos que continham solo não infestado, comparativamente com as do solo artificialmente infestado. No entanto observaram-se algumas exceções tais como em *L. rigidum*. Nesta espécie, o número de plantas de obtidas nos vasos com solo não infestado foi de 17 (68%), o que foi inferior ao número de plantas que se desenvolveram no solo infestado que foi de 21 (84%), o que resultou da não sementeira, por lapso, num dos vasos. O número de plantas de *E. sativa* obtidas em solo infestado também foi superior em 9% ao valor obtido no controlo (solo não infestado). Por último, o número final de plantas de *S. arvensis* que se observou em ambos os tratamentos foi baixo, devido à reduzida capacidade germinativa das sementes.

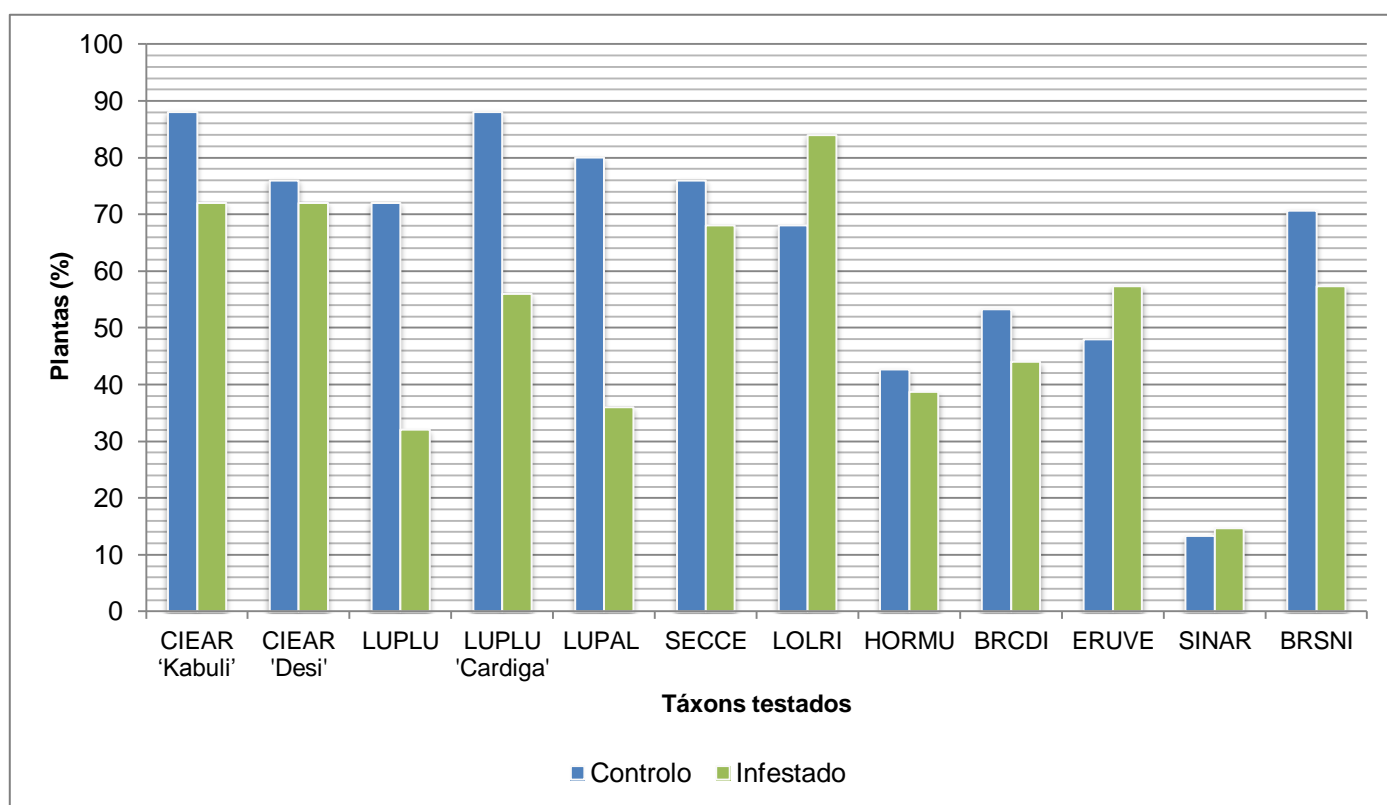


Figura 28 – Percentagem de plantas obtidas no final do ensaio, quando cultivadas em solo artificialmente infestado e não infestado (controlo) com *Phytophthora cinnamomi*

Determinou-se o peso seco da parte aérea e da parte radicular médio (por planta) em cada espécie (Fig. 29) em cada um dos tratamentos. Verificou-se que o peso seco, quer da parte aérea quer da parte radicular, de algumas espécies foi superior quando cultivadas em solo artificialmente infestado. Estes dados podem indicar que as plantas, na presença do patógeno, investem mais na produção de biomassa, tratando-se de uma possível estratégia de adaptação e sobrevivência.

Pôde-se ainda observar o baixo valor do peso seco da parte radicular de *E. sativa* e *B. nigra* que, como já foi referido, apresentavam um sistema radicular muito curto, fino e rarefeito. Como *E. sativa* não foi infectada por *P. cinnamomi*, este parâmetro não parece estar relacionado com a sua susceptibilidade à infecção pelo patógeno.

O sistema radicular de *L. luteus*, que foi a espécie testada mais susceptível a *P. cinnamomi*, tinha um peso seco muito baixo.

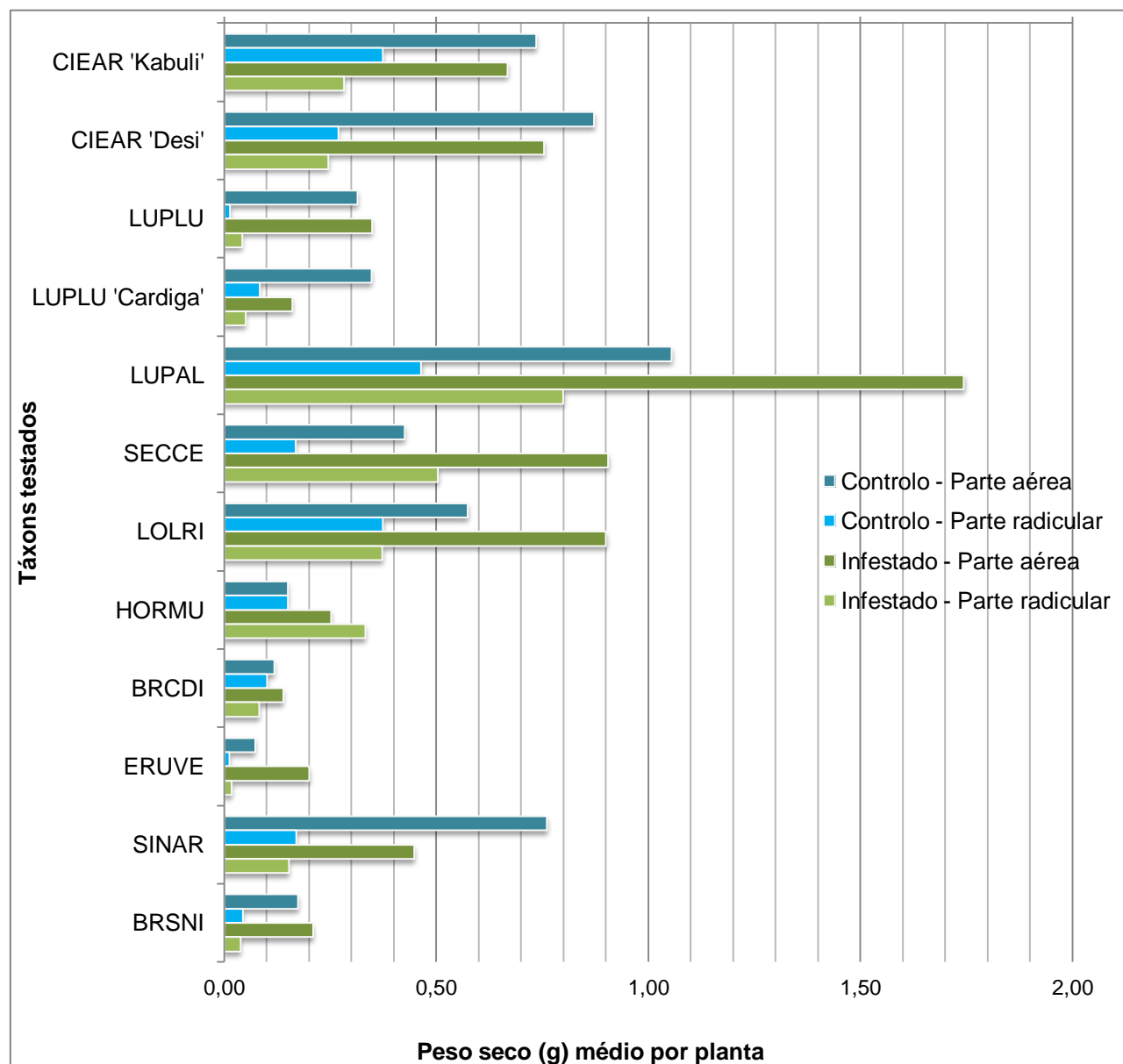


Figura 29 – Peso seco médio por planta da parte aérea e da parte radicular cultivada em solo infestado e não infestado (controlo)

Observaram-se claras diferenças nos estados fenológicos das plantas cultivadas em solo infestado e no controlo de *L. luteus* e *L. luteus* 'Cardiga', de acordo com escala BBCH referida no Anexo 4. As plantas cultivadas no controlo estavam claramente mais desenvolvidas do que as cultivadas em solo infestado por *P. cinnamomi*, o que confirma a sua elevada susceptibilidade ao patógeno.

Foi possível reisolar *P. cinnamomi* a partir das raízes de *L. luteus*, *L. luteus* 'Cardiga', *S. arvensis* e *B. nigra*. Verificou-se uma percentagem de reisolamentos superior em *L. luteus* 'Cardiga' em relação às restantes espécies o que pode indicar que esta cultivar é mais susceptível ao agente patogénico.

Nas placas de Petri com as raízes de *L. luteus* e *L. luteus* 'Cardiga', foi visível o crescimento do patógeno após 24 horas de incubação. Por outro lado, só se detectou o patógeno na placa com

raízes de *S. arvensis* após 48 horas, já em *B. nigra* o crescimento de *P. cinnamomi* só foi detectado após 120 horas de incubação em um único fragmento de raiz (Quadro 19).

No decorrer do ensaio, testou-se a viabilidade do inóculo em todos. Assim, isolou-se sempre *P. cinnamomi* a partir do solo infestado de todos os vasos. O número de propágulos em solo seco, observado no levantamento do ensaio, foi superior no solo-em que se cultivou as Fabáceas e *S. cereale*. O valor máximo dos propágulos foi obtido no solo onde se desenvolveu *L. luteus*, indicando que esta espécie pode aumentar o inóculo no solo. Por outro lado, no solo onde se desenvolveu *H. murinum* o número de propágulos obtido foi muito reduzido, sendo que seria interessante confirmar estes resultados por meio de diluições das suspensões de solo, o que não foi possível dado a escassez de tempo.

No Quadro 19 apresenta-se o resumo da avaliação das plantas nos testes de susceptibilidade.

Quadro 19 – Avaliação do estado fenológico (escala BBCH), dos sintomas das plantas cultivadas no controlo e em solo artificialmente infestado com *P. cinnamomi*, percentagem de reisolamento de *P. cinnamomi* (%RI) a partir das raízes e número de proágulos por grama de solo seco (PRP/g)

Táxon	Solo não infestado (controlo)				Solo infestado			
	Estado fenológico	Sintomas		Estado fenológico	Sintomas		RI (%)	PRP/g
		Parte aérea	Parte radicular		Parte aérea	Parte radicular		
BRSNI	2	Sem sintomas	Sem sintomas	2	Sem sintomas	Sem sintomas	5,6	85
ERUVE	4	Sem sintomas	Sem sintomas	5	Sem sintomas	Sem sintomas	0	30
SINAR	5	Sem sintomas	Sem sintomas	5	Sem sintomas	Sem sintomas	11,1	20
CIEAR 'Desi'	4	Sem sintomas	Sem sintomas	4	Sem sintomas	Sem sintomas	0	368
CIEAR 'Kabuli'	4	Sem sintomas	Sem sintomas	4	Sem sintomas	Sem sintomas	0	122
LUPAL	2	Sem sintomas	Sem sintomas	3	Sem sintomas	Sem sintomas	0	68
LUPLU	1	Sem sintomas	Sem sintomas	5	Clorose das folhas	Necroses	22,2	500
LUPLU 'Cardiga'	1	Sem sintomas	Sem sintomas	4	Clorose das folhas	Necroses	44,4	250
BRCDI	3	Sem sintomas	Sem sintomas	3	Acama e clorose das folhas	Sem sintomas	0	22
HORMU	3	Sem sintomas	Sem sintomas	3	Acama e clorose das folhas	Sem sintomas	0	2
LOLRI	3	Sem sintomas	Sem sintomas	3	Acama e clorose das folhas	Sem sintomas	0	20
SECCE	3	Sem sintomas	Sem sintomas	3	Acama e clorose das folhas	Sem sintomas	0	225

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que os extractos aquosos radiculares extraídos de plantas da flora mediterrânica podem ter efeito inibitório sobre *P. cinnamomi*. Os extractos aquosos radiculares de algumas espécies de plantas herbáceas testadas mostraram efeito inibitório para diferentes tipos de estruturas de *P. cinnamomi*. Neste trabalho pretendeu-se simular os exsudados radiculares em condições naturais, já que na natureza as substâncias são dissolvidas em água. AlKhail (2005) refere que, no seu estudo, os extractos aquosos têm uma actividade antifúngica superior aos dos extractos alcoólicos.

Sabe-se que em condições naturais a esporulação de *P. cinnamomi* é estimulada por microrganismos do solo, tais como, *Pseudomonas* spp. e *Chromobacterium violaceum* Schröter (Ayers, 1971; Zentmyer, 1965; Zentmyer e Chen, 1969; Zentmyer e Marshall, 1959;). Como o solo esterilizado por filtração ou autoclavado elimina as bactérias, perdendo assim as propriedades potenciadoras da esporulação (Zentmyer e Chen, 1969) e dado que se testaram, sem sucesso, inúmeros métodos de produção estéril de esporângios, a produção destas estruturas foi feita com base no método descrito por Tuset *et al.* (2001), no qual se recorre a uma suspensão de solo não estéril. Estas razões, bem como querermos actuar o mais próximo das condições naturais, levou-nos sempre a utilizarmos suspensão de solo não estéril para a produção de esporângios.

Os resultados dos ensaios *in vitro* revelaram tendências extremamente importantes relativamente aos efeitos dos diferentes extractos testados na actividade de *P. cinnamomi*.

Os extractos aquosos radiculares de ambas as variedades testadas de *Cicer arietinum* ('Kabuli' e 'Desi') inibiram em 100% na produção de estruturas assexuadas, designadamente de esporângios e clamidósporos, no entanto não inibiram a germinação de zoósporos produzidos em condições óptimas (em suspensão de solo) nem o crescimento micelial. Desta forma, seria necessário prosseguir os estudos com estes extractos de modo a clarificar e concluir qual a sua acção sobre o patógeno.

Como seria expectável pela bibliografia consultada (Serrano *et al.*, 2010; 2011), os EARs de *Lupinus luteus* potenciaram o crescimento do micélio. Os zoósporos libertados dos esporângios formados em presença destes extractos não se mostraram viáveis nas condições em que foram testados, situação que não corresponde ao observado em outros estudos (Serrano *et al.*, 2011). No entanto, os EARs referidos não inibiram a germinação de zoósporos (produzidos em condições óptimas) quando inoculados em meio suplementado com os extractos, mas aumentaram significativamente a produção de clamidósporos, estruturas de resistência. Não se testou a viabilidade destes clamidósporos devido a escassez de tempo, pois, podem, tal como os zoósporos não serem viáveis quando formados na presença destes extractos.

Os EARs de *Lupinus albus* também potenciaram significativamente o número de clamidósporos produzidos apesar de inibirem em 100% a produção de esporângios. Contudo, as dimensões dos clamidósporos produzidos *in vitro*, tanto no extracto da variedade comercial como no da variedade melhorada, foram muito inferiores às dimensões dos clamidósporos produzidos no controlo, tendo uma redução de cerca 35%. Estes dados sugerem que o extracto exerce acção no patógeno e que este, como resposta de sobrevivência produz elevado número de clamidósporos,

mas de reduzidas dimensões, os quais desconhecemos se são viáveis. Este resultado também foi observado na presença do extracto de *P. purpurea*. Apesar de aumentar significativamente a produção de clamidósporos, estes apresentavam dimensões muito inferiores aos produzidos no meio sem o extracto (controlo).

Neves *et al.* (2014) apontam para um efeito inibitório do EAR de *Phlomis purpurea* no crescimento micelial, na produção de esporângios e clamidósporos bem como na libertação e germinação de zoósporos. No entanto, os resultados obtidos neste estudo foram bastante diferentes. Assim, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados neste trabalho, o EAR de *P. purpurea* conduziu a uma estimulação do crescimento micelial, da produção de clamidósporos e da germinação de zoósporos quando produzidos fora da presença do extracto, apesar de inibir totalmente a produção de esporângios. Tais diferenças nos resultados podem ser devidas, em primeiro lugar, ao uso de isolamentos de *Phytophthora cinnamomi* diferentes, uma vez que estamos a trabalhar com uma espécie que apresenta elevada variabilidade, ou seja, isolamentos diferentes podem ter comportamentos muito díspares. Por outro lado, a metodologia aplicada também foi diferente no que toca aos métodos de extracção e à produção de estruturas do patógeno. A produção de estruturas de *P. cinnamomi* no trabalho de Neves *et al.* (2014) foi feita de modo totalmente estéril, enquanto que neste trabalho utilizamos técnicas o mais próximo possível do ambiente natural, pelo que, a produção de esporângios e clamidósporos foi feita com recurso a suspensão de solo não estéril.

Apesar inúmeras gramíneas terem um efeito alelopático herbicida já comprovado devido ao seu teor em benzoxazinonas (Schulz *et al.*, 2013; Tabaglio *et al.*, 2013), os seus EARs radiculares demonstraram um efeito potenciador de *P. cinnamomi*. O EAR de *Hordeum murinum* foi, de entre as gramíneas, o que conduziu a um maior aumento no crescimento micelial. Relativamente à produção de esporângios, foi com o EAR de *Lolium rigidum* que se obteve um maior número destas estruturas e por conseguinte, obteve-se também um maior número de zoósporos que se apresentavam viáveis após o teste em meio de PARPH. Ao testar o efeito dos EARs na germinação de zoósporos formados a partir de esporângios produzidos em condições óptimas, também se verificou que neste extracto, suplementado com meio de V8 sólido, a germinação dos zoósporos foi estimulada.

Os EARs obtidos a partir das Brassicáceas, *B. nigra* e *S. arvensis*, não mostraram efeito inibitório significativo na actividade do patógeno. No entanto, os EARs de *E. sativa* e *R. raphanistrum* foram os que apresentaram uma maior actividade inibitória para *P. cinnamomi* quando testados individualmente. A combinação destes dois extractos na proporção de 50:50 (v/v) num único extracto (EARc) foi testada *in vitro*, numa concentração de 75% tendo mostrado uma acção sinérgica dado que se verificou que foi com o extracto combinado que se observou a maior inibição do patógeno, quer no crescimento micelial, quer na da produção de estruturas assexuadas e germinação de zoósporos. De facto, como já foi referido, *Eruca sativa* é rica em glucosinatos alifáticos e flavonoides cujo efeito antioxidante é conhecido e pode estar envolvido na defesa da planta a *P. cinnamomi*. As moléculas antioxidantes são responsáveis pela defesa das plantas ao stress oxidativo, mecanismo este que vários autores crêem que influencia o desenvolvimento e a progressão das doenças radiculares (Kasote *et al.*, 2015; Martínez-Sánchez *et al.*, 2007). Por outro lado, inibe inúmeras bactérias Gram+ e Gram- e fungos (*Colletotrichum* spp.) (Khoobchandani *et al.*,

2010; Rizwana *et al.*, 2016). Também *R. raphanistrum* tem propriedades antifúngicas conhecidas (Sánchez-Leon *et al.*, 2015).

Das espécies testadas nos testes de patogenicidade, apenas *L. albus* e *L. luteus* são referidas na bibliografia como hospedeiros de *P. cinnamomi*, sendo *L. luteus* considerado altamente susceptível ao patógeno (Serrano *et al.*, 2011). Nos testes de patogenicidade efectuados, observou-se que as duas variedades de *L. luteus*, e ainda *S. arvenis* e *B. nigra* foram infectadas por *P. cinnamomi*, pois o patógeno foi reisolado a partir das raízes destas plantas cultivadas em solo artificialmente infestado. Contudo, não se reisolou *P. cinnamomi* a partir das raízes de *L. albus*, revelando que esta espécie pode não ser susceptível ao patógeno, o que não confere os trabalhos de Aryantha *et al.* (2000) e Kirby e Grand (1975). No entanto, a variedade testada pode ter um teor mais elevado de determinadas substâncias que já foram isoladas a partir de *Lupinus* spp. e que conferem algum grau de tolerância a *Phytophthora* spp., tais como isoflavenóides ou fitoalexinas (Coio *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2012).

O peso seco médio por planta da biomassa da raiz de *Lupinus luteus* cultivado em solo infestado foi bastante menor ao obtido de *Lupinus albus*, que foram de 41,25 e 900 mg, respectivamente. Estes resultados podem corroborar os estudos apresentados por Serrano *et al.*, (2010) que indicam que a tremocilha é mais susceptível a *P. cinnamomi* do que o tremçoço.

Na maioria das plantas cultivadas em solo artificialmente infestado observaram-se valores de biomassa radicular superiores aos obtidos nas plantas do controlo. Esta situação é interessante, pois as plantas ao produzirem mais raízes estão a reagir à infecção tentando superar a infecção, pelo que este fenómeno é conhecido como “escape da doença” e é referido por vários autores em diferentes hospedeiros relativamente à infecção causada por *P. cinnamomi* (Moreira-Marcelino, 2001; Moreira *et al.*, 1997).

Relativamente à avaliação do número de propágulos no solo, foi em *L. luteus* que se detectou o valor mais elevado quando comparado com as outras espécies. Estes resultados confirmam os estudos de Serrano *et al.* (2011) que indicam que esta espécie aumenta o inóculo do patógeno no solo. Verificou-se ainda que no solo das plantas de *H. murinum* o número de propágulos do patógeno detectados foi muito baixo, o que pode indicar que esta espécie poderá ter uma acção inibitória do inóculo, resultado que teria de ser confirmado. No solo onde se cultivaram as plantas de *L. rigidum* detectou-se também um número muito baixo de propágulos de *P. cinnamomi*, mas pelo contrário, foi observado um elevado número de colónias de bactérias, o que não aconteceu com os solos onde cresceram as outras espécies. Esta planta parece estimular o desenvolvimento de bactérias. Nos testes de inibição dos EAR verificou-se que com o extracto radicular obtido desta planta se produziu o maior número de esporângios e consequentemente de zoósporos. O resultado obtido com o EAR de *L. rigidum* indicia que o sistema radicular desta espécie pode aumentar o desenvolvimento de bactérias que potenciam a actividade de *P. cinnamomi*, aumentando a produção de esporângios e o número de zoósporos, situação a ter em atenção dado, que estes esporos são responsáveis pela disseminação do patógeno no solo e das infecções primárias.

Os resultados do presente trabalho, apresentados em resumo no Quadro 20, sugerem ainda que as espécies *E. sativa* e *R. raphanistrum* podem exercer um biocontrolo da actividade de *P. cinnamomi*, situação que pode ter interesse em áreas de montado em declínio, onde estas espécies

podem ser facilmente introduzidas através de pastagens melhoradas. Sementeiras de *L. rigidum* ou *Lupinus luteus* em áreas de montados cujo historial indique a presença e ataques de *P. cinnamomi* devem de ser evitadas.

Neste estudo privilegiamos a inovação, quer nas técnicas de avaliação do efeito dos extractos, quer nos métodos utilizados para a sua extracção.

Os resultados alcançados revelaram-se promissores e interessantes, no entanto não podem ser generalizados visto apresentarem elevada variabilidade, todavia, seria interessante repetir os ensaios tendo um número mais elevado de repetições. Em primeiro lugar, estamos a trabalhar com um organismo que apresenta um comportamento muito variável e plástico e em segundo lugar, como já se apontou acima, os organismos vivos podem apresentar comportamentos muito díspares em ambientes diferentes, designadamente em condições controladas de laboratório e na natureza. Assim, consideramos fulcral dar continuidade a estudos de Alelopatia de modo a que, futuramente, se torne uma ferramenta de biocontrolo a ser usada em Protecção de Plantas.

Para trabalhos futuros aponta-se a avaliação dos extractos radiculares das espécies seleccionadas extraídos em diferentes estados fenológicos, a determinação das substâncias a actuar nos extractos bem como a avaliação do seu efeito *in vivo* em diferentes espécies de plantas.

Quadro 20 – Resumo dos resultados obtidos em todos os ensaios

	Ensaio <i>in vivo</i> - Testes de patogenicidade	Ensaio <i>in vitro</i> - efeito dos extractos no crescimento micelial	Ensaio <i>in vitro</i> - efeito dos extractos na produção de estruturas assexuadas		Ensaio <i>in vitro</i> - efeito dos extractos na produção, libertação e viabilidade dos zoósporos		Ensaio <i>in vitro</i> - efeito dos extractos na germinação de zoósporos	Efeito inibitório
Espécie	Infecção das raízes	Crescimento micelial	Produção de clamidósporos	Produção de esporângios	Zoósporos produzidos	Viabilidade dos zoósporos produzidos		
BRSNI	●	●	●	●	●	●	●	✗
ERUVE	●	●	●	●	n.a.	n.a.	●	✓
RAPRA	●	●	●	●	n.a.	n.a.	●	✓
SINAR	●	●	●	●	●	●	●	✗
ERUVE+RAPRA	n.a.	●	●	●	n.a.	n.a.	●	✓
CIEAR 'Desi'	●	●	●	●	n.a.	n.a.	●	?
CIEAR 'Kabuli'	●	●	●	●	n.a.	n.a.	●	?
LUPAL	●	●	●	●	n.a.	●	●	✗
LUPAL 'Estoril'	●	●	●	●	n.a.	n.a.	●	✗
LUPLU	●	●	●	●	●	●	●	✗
LUPLU 'Cardiga'	●	●	●	●	●	●	●	✗
PLMPU	●	●	●	●	n.a.	n.a.	●	✗
BRCDI	●	●	●	●	●	●	●	✗
HORMU	●	●	●	●	●	●	●	✗
LOLRI	●	●	●	●	●	●	●	✗
SECCE	●	●	●	●	●	●	●	✗

Legenda:

Testes de patogenicidade

●	Hospedeiro
●	Não hospedeiro

Ensaio *in vitro*

●	INIB<0%
●	0%<INIB<100%
●	INIB=100%

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objectivo seleccionar espécies de plantas herbáceas com efeito alelopático para *Phytophthora cinnamomi*, as quais pudessem ser introduzidas em áreas de montado através de pastagens.

Os organismos vivos têm comportamentos diferentes conforme estejam em ambiente controlado, designadamente *in vitro*, ou em habitat natural. Os resultados do trabalho realizado em condições controladas de laboratório apresentam tendências, pelo que é necessário testar qual o efeito das espécies seleccionadas em *P. cinnamomi*, num ambiente natural, designadamente em solo naturalmente infestado, de modo a confirmar os seus efeitos no patogénio.

Das espécies testadas, verificou-se que, para além de *Lupinus luteus*, também *Sinapis arvensis* e *Brassica nigra* foram infectadas por *P. cinnamomi*. Nenhuma das espécies de Poáceas foi infectada, bem como *Cicer arietinum* e *Eruca sativa*.

Nos ensaios *in vitro*, os extractos de *Eruca sativa* e de *Raphanus raphanistrum* testados individualmente revelaram um efeito inibitório para *P. cinnamomi*, no entanto, a combinação destes dois extractos numa proporção de 50:50 (v/v) resultou numa acção sinérgica, apresentando um resultado de maior inibição do patogénio. Por outro lado, os extractos das espécies de Poaceae mostraram tendência para potenciar a actividade do patogénio, não só estimulando a produção de esporângios, a formação e a germinação de zoósporos (*Lolium rigidum*), como também a produção de clamidósporos (*Hordeum murinum*).

Embora não se tenha ainda comprovado *in vivo* o efeito inibitório no patogénio das espécies seleccionadas, os resultados apresentados, apesar de preliminares, são promissores.

A única solução para o controlo de *Phytophthora cinnamomi* consiste numa abordagem preventiva de gestão integrada que associe várias medidas culturais e biológicas

Como tal, a incorporação de plantas com efeito alelopático em pastagens nos Montados parece ser uma alternativa válida e sustentável, com bom potencial, a ser incorporada nas medidas de biocontrolo do patogénio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkhail A., 2005. Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **8**, 413-417, doi: 10.3923/pjbs.2005.413.417
- Alves A., Correia A., Luque J., Philips A., 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. Nov. on *Quercus* species with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. *Mycologia*, **96** (3), 598-613, doi: 10.2307/3762177
- Alves C., 2014. Studies on cork oak decline: an integrated approach. Tese para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias, Universidade de Évora, Évora
- Amimi R., Na M., Pratley J., Azimi S., 2009. Allelopathic assessment of annual ryegrass (*Lolium rigidum*): bioassays. *Allelopathy Journal*, **24** (1), 67-76
- Anónimo, 200-. Factors affecting behavior and the phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Allelopathy is...* (Disponível em: <http://pirun.kps.ku.ac.th/~g522710004/page2.html>, acessado a 20 de Janeiro de 2017)
- Araniti F., Sorgona A., Lupini A., Abenavoli M., 2012. Screening of Mediterranean wild plant species for allelopathic activity and their use as bio-herbicides. *Allelopathy Journal*, **29** (1), 107-124
- Aryantha I., Cross R., Guest D., 2000. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. *The American Phytopathological Society*, **90** (7) 775-782, doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.7.775
- Associação Portuguesa da Cortiça – APCOR, 2015. CORK 2015 – Boletim Estatístico (Disponível em: <http://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2015/12/APCOR-Boletim-Estatistico.pdf>, acessado a 9 de Agosto de 2016)
- Associação Portuguesa da Cortiça – APCOR, 2016. Flora (Disponível em: <http://www.apcor.pt/montado/biodiversidade/flora/>, acessado a 5 de Outubro de 2016)
- Associação Portuguesa da Cortiça – APCOR, 2016. Floresta (Disponível em: <http://www.apcor.pt/montado/floresta/>, acessado a 5 de Outubro de 2016)
- Associação Portuguesa da Cortiça – APCOR, 2016. História (Disponível em: <http://www.apcor.pt/cortica/factos-curiosidades/historia/>, acessado a 5 de Outubro de 2016)
- Ayers W., 1971. Induction of sporangia in *Phytophthora cinnamomi* by a substance from bacteria and soil. *Canadian Journal of Microbiology*, **17** (12), 1517-1523, doi: 10.1139/m71-242
- Bajwa R., Anjum T., Shafiq S., Shafique S., 2006. Evaluation of antifungal activity of *Cicer arietinum* L. *Pakistan Journal of Botany*, **38** (1), 175-184
- Barros M. C., Calado N., Gomes A., Inácio M., Lopes F., Marcelino A. C., Sousa E., Varela M. C., 2006. Boas Práticas de Gestão em Sobreiro e Azinheira. Lisboa: Direcção Geral dos Recursos Florestais
- Belo C., Pereira M., Moreira A. C., Coelho I., Onofre N., Paulo A., 2009. Capítulo 8. Montado In: Pereira H., Domingos T., Vicente L., Proença V., (eds). *Ecossistemas e Bem-estar Humano. Avaliação para Portugal do Millennium Ecosystem Assessment*. Escolar Editora. 734 pp
- Branco M., Bragança H., Sousa E., Phillips A., 2014. Pests and Diseases in Portuguese Forestry: Current and New Threats - Chapter 5, 117–154. In: Reboredo F., (ed), *Forest 47 Context*

and Policies in Portugal-Present and Future Challenges, World Forests, Vol.19, Suíça: Springer International Publishing

Brasier C.M., 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annales des Sciences Forestieres* **53** (2-3), 347-358, doi: 10.1051/forest:19960217

Brasier C. M., 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol.* **57**, 792-808, doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x

Brasier C. M., Robredo F., Ferraz J. F., 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, **42** (1), 140-145, doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01482.x

Broadbent P., Baker K. F., 1974. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. *Australian Journal of Agricultural Research*, **25** (1), 121-137, doi: 10.1071/AR9740121

Burges A., 1967. The soil system. In: Burges A., Raw F. (eds.), *Soil Biology*. New York, USA: The American Press Inc.

Caboun V., John J., 2015. Allelopathy research methods in forestry. *Allelopathy Journal*, **36** (2), 133-166

Caetano P., 2007. Envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de *Quercus suber* e *Q. rotundifolia*: estudo da influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença - Possibilidades de controlo químico do declínio. Tese para a obtenção do grau de doutor no ramo de Ciências Agrárias, especialidade de Protecção de Plantas, Faculdade de Engenharia de Recursos Naturas, Universidade do Algarve, Faro

Caetano P., Sánchez J., Sánchez M., Trapero A., 2010. Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. *Consejería de Medio Ambiente, Universidad de Córdoba*

Carlile M.J., 1983. Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. In: Erwin D., Bartnicki-Garcia S., Tsao P. (eds), *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*, St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 95-107

Castillo-Reyes F., Hernández-Castillo D., Clemente-Constantino J., Gallego-Morales G., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C., 2015. In vitro antifungal activity of polyphenols-rich plant extracts against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *African Journal of Agricultural Research*, **10** (50), 4554-4560, dou: 10.5897/AJAR2013.8072

Cela P.G., Gamarra R.G., Viñas J.I., 1998. Árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Madrid, Espanha: Ediciones Jaguar

Ceia R. S., Ramos J. A., 2016. Birds as predators of cork and holm oak pests. *Agroforestry Systems*, **90**, 159-176, doi: 10.1007/s10457-014-9749-7

Chandrashekara C., Bhatt J., Kumar R., Chandrashekara K., 2012. Supressive soils in plant disease management. In: Singh V., Singh Y., Singh A., *Eco-friendly Inovative Approaches in Plant Disease Management*, 241-256, Mumbai, India: International Book Distributors

Chee K. e Newhook F.J., 1965. Improved methods for use in studies on *Phytophthora cinnamomi* Rands. and other *Phytophthora* species. *New Zeland Journal of Agriculture Research*, **8** (1), 88-95, doi: 10.1080/00288233.1965.10420024

Cheng F., Cheng Z., 2015. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, **6** (1020) 1-16, doi: 10.3389/fpls.2015.01020

Cobos J., Montoya R., Tuset J., 1993. New damage to the *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. In: Proc. Int. Congress "Recent Advances in Studies on Oak Decline". Dipart. di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Bari, Italia. 163-169

Coelho V., 2009. Efeito do fosfanato de potássio na protecção das raízes do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) contra *Phytophthora cinnamomi*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Agroecologia. Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança

Coffey M. D., Joseph M. C., 1985. Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. *Phytopathology*, **75**, 1042-1046, doi: 10.1094/Phyto-75-1042

Cosio E. G., Feger M., Miller C. J., Antelo L., Ebel J., 1996. High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. *Planta*, **200** (1), 92-99, doi: 10.1007/BF00196654

Costa M., 1990. Um exercício de cartografia autófitica para o algarve. Estação agronómica Nacional, Oeiras

Costa A., Pereira H., Madeira M., 2009. Analysis of spatial patterns of oak decline in cork oak woodlands in Mediterranean conditions. *Annals of Forest Science*, **67** (2), 1-7, doi: 10.1051/forest/2009097

Crone M., McComb J., O'Brien P., Hardy G., 2013. Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species. *Fungal Biology*, **117**, 112-123, doi: 10.1016/j.funbio.2012.12.004

D'Souza N., Colquhoun I., Shearer B., Hardy G., 2005. Assessing the potential for biocontrol of *Phytophthora cinnamomi* by fifteen native Western Australian jarrah-forest legume species. *Australasian Plant Pathology*, **34** (4) 533-540, doi: 10.1071/AP05067

Decreto-Lei n.º 117/2012, II série A/XII (Disponível em: <http://debates.parlamento.pt/catalogo/r3/dar/s2a/12/01/117/2012-02-09/4?pgs=4&org=PLC>)

DGAV: Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, 2001. Fosetil – Condições de Utilização Autorizadas – Produtos fitofarmacêuticos (Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3666289&generico=3666304&cboui=3666304>, acedido a 7 de Setembro de 2016)

Direcção Geral dos Recursos Florestais – DGRF, 2007. Análise da Evolução do Comércio Externo de Produtos Florestais. Lisboa: Direcção Geral dos Recursos Florestais.

Directiva 92/43/CEE de 27 de Julho de 1992, Comunidade Europeia (Disponível em: <https://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/2001/05/121A00/30533059.pdf>, acedido a 15 de Novembro de 2016)

- Downer A.J., Menge J. A., Pond R., 2001. Association of cellulytic enzyme activities in eucalyptus mulches with biological control of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **91** (9), 847-855, doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.847
- Downer A.J., Menge J. A., Pond R., 2001. Effects of cellulytic enzymes on *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **91** (9), 839-846, doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.839
- Dunne C., 2004. Control of sudden death in cultivated proteas from the South west of Western Australia. PhD Thesis. Murdoch University. Australia
- Duvenhage J. A., Kotzé J. M., Mass M. C., 1991. Supressive soils and biological controlo of *Phytophthora* root rot. South African Avocado Growers' Association Yearbook, **14**, 6-11
- Erwin D.C., Ribeiro O.K., 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. Saint Paul, Minnesota, United States of America: APS Press
- Espírito Santo M., 1991. A vegetação natural portuguesa. In: Menzel-Teltenborn H., Neubauer H., Wunsch W., Caixinhas L., Monteiro A., Vasconcelos T., Espírito Santo D. (eds.), *Botânica II*, Círculo de Leitores: Lisboa
- Farooq M., Jabran K., Cheema Z., Wahid A., Siddique K., 2011. The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science*, **67** (5), 493-506 , doi: 10.1002/ps.2091
- Ferraz J.F.P., 2006. A doença do declínio da azinheira e do sobreiro, vista pelos agricultores. Comentários a propósito de uma reportagem publicada no jornal “Público” de 28 de Março de 2005. In: O Porco da Raça Alentejana e o Declínio do Sobreiro e da Azinheira. Primeiras Jornadas Técnicas da Feira de Garvão. Lisboa: Edições Colibri, 54-76.
- Ferreira D., 2001. Evolução da paisagem de montado no Alentejo interior ao longo do século XX: Dinâmica e incidências ambientais. *Finisterra*, **36** (72), 179-193, doi: 10.18055/Finis1633
- Finlay A. R., McCracken A. R., 1991. Microbial suppression of *Phytophthora cinnamomi*. In: Lucas J. A., Shattock R. C., Shaw D. C., Cooke L. R. (eds.), *Phytophthora*, Cambridge: The British Mycological Society, Cambridge University Press, 383-398
- Flora.on - Sociedade Portuguesa de Botânica, 2016. *Quercus rotundifolia* Lam. (Disponível em: <http://flora-on.pt/index.php?q=Quercus+rotundifolia>, acedido a 1 de Agosto de 2016)
- Flora.on - Sociedade Portuguesa de Botânica, 2016. *Quercus suber* L. (Disponível em: <http://flora-on.pt/index.php?q=Quercus+suber>, acedido a 1 de Agosto de 2016)
- Giles B., 1984. A comparison between quantitative and biochemical variation in the wild barley *Hordeum murinum*. *Evolution*, **38** (1), 34-41, doi: 10.2307/2408544
- Godinho S., Guiomar N., Machado R., Santos P., Sá-Sousa P., Fernandes J., Neves N., Pinto-Correia T., 2016. Assessment of environment, land management and spatial variables on recente changes in *montado* land cover in southern Portugal. *Agroforestry Systems*, **90**, 177-192, doi: 10.1007/s10457-014-9757-7
- Gouveia M. E., 1993. Doença da tinta do castanheiro – Avaliação da resistência à *Phytophthora cinnamomi* Rands. Dissertação de mestrado para a obtenção do grau de Mestre em Protecção Integrada, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa
- Hack H., Bleiholder H., Feller C., Hess M., Buhr L., Meier U., van den Bom T., , Lancashire P., Klose R., Strauss R., 1992. The extended BBCH-scale. In: Meier U. (ed), 2001. Growth stages of mono and dicotyledonous plants – BBCH Mopnograph, Federal Biological Research Centre for

Agriculture and Forestry (Disponível em: <https://www.politicheagricole.it/flex/AppData/WebLive/Agrometeo/MIEPFY800/BBCHengl2001.pdf>,
acedido a 28 de Janeiro de 2016)

Hardham A. R., 2001. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. Australasian Plant Pathology, **30** (2), 91-98, doi: 10.1071/AP01006

Hardham A. R., 2005. Pathogen profile - *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology, **6** (6), 589-604, doi: 10.1111/J.1364-3703.2005.00308.X

Henriques J., 2009. Micorrizas – um bom negócio entre plantas e fungos. Naturlink (Disponível em: <http://naturlink.pt/article.aspx?menuid=66&cid=3149&bl=1&viewall=true>,
acedido a 13 de Novembro de 2016)

Henriques J., Nóbrega F., Sousa E., Lima A., 2014. Diversidade do carvão do entrecasco no sobreiro. In: 4º Encontro REDECOR, Oeiras

Inácio M. L., Henriques J., Guerra-Guimarães L., Gil Azinheira H., Lima A., Sousa E., 2011. *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae) transports *Biscogniauxia mediterranea*, agente of cork oak charcoal canker. Boletín de Sanidad Vegetal – Plagas, **37**, 181-186

Inderjit, Mukerji K. G., 2006. Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases. The Netherlands: Springer

Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade – ICNB, 200-. Habitat 6310 – Montados de *Quercus* spp. de folha perene (Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/rn2000/resource/docs/rn-plan-set/hab/hab-6310/view>,
acedido a 8 de Outubro de 2016)

Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas – ICNF, 2015. Controlo do declínio de montados de sobre e azinho (Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/foflo/pdr2020/resource/doc/M%20sobre%20e%20azinho-req-espec.pdf>,
acedido a 22 de Novembro de 2016)

Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas – ICNF, 2015. 6º Inventário Nacional florestal (6º INF) – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental (Resultados preliminares) (Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ifn/resource/ficheiros/ifn/ifn6-res-prelimv1-1>,
acedido a 22 de Novembro de 2015)

Instituto Nacional de Estatística – INE (2009), Estatísticas Agrícolas – 2008. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística

Instituto Nacional de Estatística – INE (2016), Estatísticas Agrícolas –2015. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística

Instituto Nacional de Investigação Agrícola e Veterinária, I.P., 2015. Recomendações para a gestão de áreas com Fitóftora (Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:rYeCVdYtpAJ:observatoriodehesamontado.gobex.es/paginas/descargar_adjunto.php%3Fid_adjunto%3D84%26id_pagina%3D211+&cd=3&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt&client=firefox-b-ab,
acedido a 10 de Janeiro de 2017)

- Jackson S. L., Hardham A. R., 1996. A transient rise in cytoplasmic free calcium is required for the induction of cytokinesis in zoospores of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Cell Biology*, **69** (2), 180-188, PMID: 8907619
- Javaid A., 2007. Allelopathic interactions in mycorrhizal associations. *Allelopathy Journal*, **20** (1), 29-42, doi: 10.1111/pce.12117
- Jeffers S., Martin S., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, **70** (11), 1038-1043, doi: 10.1094/PD-70-1038
- Kasote D., Katyare S., Hedge M., Bae H., 2015. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, **11** (8), 982-991, doi: 10.7150/ijbs.12096
- Khoobchandani M., Ojeswi B., Ganesh N., Srivastava M., Gabbanini S., Matera R., Iori R., Valgimigli L., 2010. Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: comparison with various aerial and root plant extracts. *Food Chemistry*, **120** (1), 217-224, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.011
- Kirby H., Grand L., 1975. Susceptibility of *Pinus strobus* and *Lupinus* spp. to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **65**, 693-695, doi: 10.1094/Phyto-65-693
- Kouzai Y., Kimura M., Yamanaka Y., Watanabe M., Matsui H., Yamamoto M., Ichinose Y., Toyoda K., Onda Y., Mochida K., Noutoshi Y., 2016. Expression profiling of marker genes responsive to the defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology*, **16** (59), 1-12, doi: 10.1186/s12870-016-0749-9
- Leitão N., 2000. Montado, um estado da sucessão ecológica no sul de Portugal – Naturlink (Disponível em: <http://naturlink.pt/article.aspx?menuid=3&cid=1508&bl=1&viewall=true>, acessado a 13 de Dezembro de 2016)
- Lima A., 2014. Micologia. Aparentamentos das aulas da Unidade Curricular Patologia Vegetal, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa
- López J., García S., Isidró M., Cuellar R., 2011. Efecto alelopático del extracto de tabaco (*Nicotiana glauca* L.) sobre algunos cultivos económicos. *Ilustrados*, Versão online (Disponível em: <http://www.ilustrados.com/tema/785/Efecto-alelopatico-extracto-tabaco-nicotiana-tabacum.html>, acessado em 12 de Dezembro de 2015)
- Macías F. A., Molinillo J. M., Varela R., Galindo J. C., 2007. Review – Allelopathy - a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, **63** (4), 327-348, doi: 10.1002/ps.1342
- Malajczuk N., 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In: *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology* (eds Erwin D. C., Bartnicki-Garcia S., Tsao P. G.) St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 197-218.
- Martinez-Sánchez A., Llorach R., Gil M., Ferreres F., 2007. Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplomatix tenuifolia*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **55** (4), 1356-1363, doi: 10.1021/jf063474b
- Mazzola M., 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, (1-4), 557-564, PMID: 12448751

- Miguel J. F., 2014. Integração da flora autóctone nos espaços verdes públicos – aplicação ao concelho de Albufeira. Relatório de estágio para a obtenção do grau de Mestre em Arquitectura Paisagística, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro
- Mircetich S. M., Zentmyer G. A., 1967. Existence of *Phytophthora cinnamomi* as chlamydospores and oospores in roots and soil. California Avocado Society Yearbook **51**, 117-124
- Moreira A. C., 2011. A doença das quercíneas em Portugal- Formas de mitigar o problema. In: Coelho P., Reis P., Agrorural – Contributos Científicos, Lisboa, Portugal: Imprensa Nacional-Casa da Moeda
- Moreira A. C., 2014. O envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio dos montados. In: 4º Encontro REDECOR: O Montado de Sobro e a Fileira da Cortiça em Portugal e Espanha, INIAV, Quinta do Marquês, Oeiras
- Moreira-Marcelino A. C., 2001. Aspectos da interacção entre *Phytophthora cinnamomi* e a doença do declínio em *Q. suber* e *Q. rotundifolia*. Dissertação para prestação de provas de doutoramento, Faculdade de Engenharia de Recursos naturais, Universidade do Algarve, Faro, 279 pp
- Moreira A. C., Ferraz J. F., Clegg J. M., 1997. Susceptibility of *Quercus suber* and *Q. rotundifolia* to infection to *Phytophthora cinnamomi*. In: Proceedings del 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union: Montpellier, 427-431
- Moreira A. C., Martins J. M., 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. Forest Pathology, **35** (3), 145-162, doi: 10.1111/j.1439-0329
- Moricca S., Linaldeddu B., Ginetti B., Scanu B., Franceschini A., Ragazzi A., 2016. Endemic and emerging pathogens threatening cork oak trees: management options for conserving a unique forest ecosystem. Plant Disease, **100** (11), 2184-2194, doi: 10.1094/PDIS-03-16-0408-FE
- Mullerin S., Smith J., 2015. Bot canker ok oak in Florida caused by *Diploidia corticola* and *D. quercivora*. School of Forest Resources and Conservation, IFAS Extension. University of Florida (Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FR/FR38600.pdf>, acedido a 5 de Dezembro de 2016)
- Natividade J. V., 1950. Subericultura. 2ª edição. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Direcção geral das Florestas, Imprensa Nacional-Casa da Moeda, Lisboa
- Neves D., 2014. Evaluation of the protective effect of *Phlomis purpurea* against *Phytophthora cinnamomi* in Fagaceae and of root metabolites involved. Tese para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Agrárias com especialização em Protecção de Plantas, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro
- Neves D., Caetano P., Oliveira J., Maia C., Horta M., Sousa N., Salgado M., Dionísio L., Magan N., Cravador A., 2014. Anti-*Phytophthora cinnamomi* activity of *Phlomis purpurea* plant and root extracts. European Journal of Plant Pathology, **138** (4), 835-846, doi: 10.1007/s10658-013-0357-6
- Olivier C., Vaughn S., Mizubuti E., Loria R., 1999. Variation in allyl isothiocyanate production within *Brassica* species and correlation with fungicidal activity. Journal of Chemical Ecology, **25** (12), 2687-2701, doi: 10.1023/A:1020895306588

Pacheco A., 2009. Vegetação espontânea de olivais intensivos no baixo Alentejo. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agronómica - Hortofruticultura e Viticultura, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa

Palinhos L., 1994. Contribuição para o estudo do controlo de *Phytophthora cinnamomi* Rands por solarização do solo em viveiros florestais de castanheiro. Trabalho de fim de curso da Licenciatura em Engenharia da Multiplicação de Plantas, Escola Superior Agrária de Santarém, Santarém

Palma J., Paulo J., Tomé M., 2014. Carbon sequestration of modern *Quercus suber* L. silvoarable agroforestry systems in Portugal; a YieldSAFE based estimation. *Agroforestry Systems*, **88**, 791-801, doi: 10.1007/s10457-014-9725-2

Patacho D., 2016. A importância dos Montados de sobro em Portugal. *Quercus* – Associação Nacional de Conservação da Natureza (Disponível em: <http://www.quercus.pt/artigos-floresta/2411-a-importancia-dos-montados-de-sobro-em-portugal>, acedido a 4 de Setembro de 2016)

Pereira C., 2009. Sobreiros e Montados. Naturlink (Disponível em: <http://naturlink.pt/article.aspx?menuid=3&cid=92599&bl=1&viewall=true>, acedido a 9 de Novembro de 2016)

Pinto A., Morais A., 1997. Solarização do solo – um contributo para a sua aplicabilidade em Cabo Verde, Instituto Politécnico de Viseu (Disponível em: http://www.ipv.pt/millennium/esf8_solo.htm, acedido a 21 de Novembro de 2016)

Pinto da Fonseca A., 2009. O montado na História. Pensar Montado, Herdade do Freixo do Meio (Disponível em: <http://www.herdadedofreixodomeio.com/images/pdf/histria%20do%20montado%20-%20verso%202009.pdf>, acedido a 5 de Outubro de 2016)

Pinto-Correia T., Mascarenhas J., 1999. Contribution to the extensification/intensification debate: new trends in the Portuguese *montado*. *Landscape and Urban Planning*, **46** (1-3), 125-131, doi: 10.1016/S0169-2046(99)00036-5

Pinto-Correia T., Ribeiro N., Potes J., 2013. O Livro Verde dos Montados. Évora, Portugal: ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas

Pistininzi M., Weiss E., Achtemeier L., Hong C., 2013. Zoospore production biology of pythiaceus plant pathogens. *Journal of Phytopathology*, **162**, 69-80, doi: 10.1111/jph.12154

Projecto Floresta Comum, 2016. O Programa (Disponível em: <http://www.florestacomum.org/o-programa/>, acedido a 5 de Outubro de 2016)

Projecto Life Habitat – Lince Abutre, 2014 (Disponível em: <http://www.habitatlinceabutre.lpn.pt/Homepage/O-Projecto/Resumo/List.aspx?tabid=2392&code=pt>, acedido a 13 de Dezembro de 2016)

Phillips D. H., Burdekin D. A., 1992. *Diseases of Forest and Ornamental Trees*. (2nd edition), London: The MacMillan Press.

Rêgo F., Vasco I., Carvalho J., Bugalho M., Morgado A., Silva L., 2008. Sobreiro, uma barreira contra a desertificação. WWF Mediterranean Programme; Roma, Itália

Ribeiro N., 2008. M1. Universidade de Évora (Disponível em: <http://home.dfit.uevora.pt/~nribeiro/M1.pdf>, acedido a 17 de Janeiro de 2017)

- Rigo D., Caudullo G., 2016. *Quercus ilex* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J., Rigo D., Caudullo G., Durrant T. H. , Mauri A. (eds.), European Atlas of Forest Tree Species, Luxembourg:: Publication Office of the European Union
- Ríos P., Obregón S., González M., Haro A., Sánchez M. E., 2016. Screening brassicaceous plants as biofumigants for management of *Phytophthora cinnamomi* oak disease. Forest Pathology, **46** (6), 1-8, doi: 10.1111/efp.12287
- Ríos P., Obregón S., Haro A., Fernández-Rebollo P., Serrano M., Sánchez M. E., 2016. Effect of *Brassica* biofumigant amendments on different stages of the life cycle of *Phytophthora cinnamomi*. Journal of Phytopathology, **164** (9), 582-594, doi: 10.1111/jph.12482
- Rizwana H., Alwhibi M., Khan F., Soliman D., 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of *Eruca sativa* seeds against pathogenic bacteria and fungi. The Journal of Animal and Plant Sciences, **26** (6), 1859-1871, ISSN: 1018-7081
- Robin C., Desprez-Loustau M., Capron G., Delatour C., 1998. First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. Annales des Sciences Forestieres, **55** (8), 869-883, doi: 10.1051/forest:19980801
- Rodrigues P., 2013. Alelopatia. Agrotec, **7**, 47-49
- Rossmann A., Palm M., 2006. Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi?. Pest Management, **17** (15), 217-219, doi: 10.1564/17oct08
- Saavendra M., Pastor M., 1994. La flora del olival y el uso de herbicida. Agricultura, **746**, 218-222
- San Emeterio L., Arroyo A., Canals R., 2004. Allelopathic potencial of *Lolium rigidum* Gaud. On the early growth of three associated pasture species. Grass and Forage Science, **59** (2), 107-112, doi: 10.1111/j.1365-249
- Sánchez-León G., Vargas-Rincón A., Jiménez P., 2015. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* L. sobre três hongos fitopatogénos. Bioagro, **27** (1), 3-10, ISSN: 1316-3361
- Sánchez-Moreiras A., Weiss O., Roger M., 2003. Allelopathic evidence in the Poaceae. The Botanical Review, **69** (3), 300-319, doi: 10.1663/0006-8101(2003)069[0300:AEITP]2.0.CO;2
- Santos N., 2003. Contribuição para o conhecimento das relações *Quercus suber* – *Biscogniauxia mediterranea* (syn. *Hypoxylon mediterraneum*). Silva Lusitana, **11** (1), 21-29, ISSN: 0870-6352
- Scanu B., Linaldeddu B. T., Franceshini A., Anselmi N., Vannini A., Vettraino A. M., 2013. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak forests in Italy. Pathology, **43** (4), 340-343, doi: 10.1111/efp.12039
- Schulz M., Marocco A., Tabaglio V., Macias F., Molinillo J., 2013. Benzoxazinoids in rye allelopathy – from discovery to application in sustainable weed control and organic farming. Journal of Chemical Ecology, **39** (2), 154-174, doi: 10.1007/s10886-013-0235-x
- Scognamiglio M., D'Abrosca B., Esposito A., Fiorentino A., 2013. Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. Phytochemistry Reviews, **12** (4), 1-29, doi: 10.1007/s11101-013-9281-9
- Sealy R., Evans M., Rothrock C., 2007. The effect of a garlic extract and root substrate on soilborne fungal pathogens. Horticulture Technology, **17** (2), 169-173

- Serrano M., Fernández-Rebollo P., 2011. La fertilizació cálcica para el control de la podredumbre radical de la encina. *Vida Rural*, 14-19, ISSN: 0213-6910
- Serrano M., Fernández-Rebollo P, De Vita P., Trapero-Casas A., Sánchez, 2010. *Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oakrangeland ecosystems. *European Journal of Plant Pathology*, **128**, 149-152, doi: 10.1007/s10658-010-9652-7
- Serrano M., Fernández-Rebollo P, De Vita P., Carbonero M., Sánchez, 2011. The role of yellow lupin (*Lupinus luteus*) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems. *Forest Pathology*, **41**, 382-386, doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00694.x
- Shen G., Huhman D., Lei Z., Snyder J., Sumner L., Dixon R., 2012. Characterization of an isoflavenoid-specific prenyltransferase from *Lupinus albus*. *Plant Physiology*, **159** (1), 70-80, doi: 10.1104/pp.112.195271
- Simões M., Belo A., Fernandes M., Madeira M., 2015. Regeneration patterns of *Quercus suber* according to montado management systems. *Agroforestry Systems*, **90** (1), 1-15, doi: 10.1007/s10457-015-9818-6
- Singh H., Batish D., Hohli R., 2001. Allelopathy in agroecosystems: an overview. The Haworth Press, Inc, 1-42, doi: 10.1300/J144v04n02_01
- Sousa E., Santos M., Varela M., Henrique J., 2007. Perda de vigor dos montados de sobro e azinho e análise da situação e perspectivas (Documento de síntese). Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, Estação Florestal Nacional, Oeiras
- Souza E., 2012. Estado fitossatitário do montado de sobro. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia e gestão Ambiental, Faculdade de Ciências, Universidade do Algarve, Faro
- Stapleton J., Summers C., Mitchell J., Prather T., 2010. Deleterious activity of cultivated grasses (Poaceae) and residues on soilborne fungal, nematode and weed pests. *Phytoparasitica*, **38**, 61-69, doi: 10.1007/s12600-009-0070-3
- Sundseth K., 2010. Natura 2000 na Região Mediterrânica. Bruxelas, Bélgica: Comissão Europeia (Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/nature/info/pubs/docs/biogeos/Mediterranean/KH7809610PTC_002.pdf, acedido a 4 de Outubro de 2016)
- Tabaglio V., Marocco A., Schulz M., 2013. Allelopathic cover crop of rye for integrated weed control in sustainable agroecosystems. *Italian Journal of Agronomy*, **8** (5), 35-40, doi: 10.4081/ija.2013.e5
- Tapias R., Moreira A.C., Cravador A., Fernández M., Alcuña M.M., Séanz A., Domingos A.C., Melo E., 2005. Variability of tolerance/resistance of *Quercus suber* L. seedlings to *Phytophthora cinnamomi* Rands. Survival and growth evaluation. In: New challenges for the integration of cork oak forests and products. Abstracts Book. *Suberwood*, 2005.Universidad de Huelva, Spain, 102-103, doi: 10.13140/2.1.4966.1128
- Tapias R., Fernández M., Moreira A.C., Sánchez E., Cravador A., 2006. Posibilidad de la variabilidad genética de encinas y alcornoques en la conservación y recuperación de bosques amenazados por la “seca”. *Boletín informativo CIDEU* **1**, 45-51, ISSN: 1885-5237

- Taylor A.F.S., 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil*, **244** (1), 19–28, doi: 10.1023/A:1020279815472
- Tuset J. J., Cots F., Hinarejos C., Mira J. L., 2001. Suspensiones de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la “seca” en cinco especies de *Quercus* mediterráneos. Boletín Sanidad Vegetal - Plagas, **27** (1), 103-115, ISSN: 0213-6910
- Tuset J. J., Hinarejos C., Mira J. L., Cobos J. M., Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la “seca” de encinas y alcornoques. Boletín de Sanidad Vegetal – Plagas, **22** (3), 491-499, ISSN: 0213-6910
- Tsuzuki E., Dong Y., 2003. Buckwheat allelopathy: Use in weed management. *Allelopathy Journal*, **12** (1), 1-11
- Unsworth J., 2010. Biopesticides. IUPAC (Disponível em: http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=7, acedido a 14 de Dezembro de 2016)
- You M., Sivasithamparam K., 1995. Changes in microbial populations of an avocado plantation mulch supressive of *Phytophthora cinnamomi*. *Applied Soil Ecology*, **2** (1), 33-43, doi: 10.1016/0929-1393(95)98123-C
- Weste G., 1983. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. In: Erwin D. C., Bartnicki-Garcia S., Tsao P. H. (eds.), *Phytophthora - Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*,) St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 237-257
- Widmer T.L., Laurent N., 2006. Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, **115**, 377-388, doi: 10.1007/s10658-006-9024-5
- Zentmyer G. A., 1965. Bacterial stimulation of *Phytophthora cinnamomi* sporangium. *Science*, **150**, 1178-1179, doi: 10.1126/science.150.3700.1178
- Zentmyer G. A., 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the disease it causes. Monograph **10**, St Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society
- Zentmyer G. A., 1988. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. *Transactions of the British Mycological Society*, **91** (3), 367-378, doi: 10.1016/S0007-1536(88)80111-6
- Zentmyer G. A., Chen D., 1969. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in pure culture. *California Avocado Society Yearbook*, **53**. 103-107
- Zentmyer G. A., Marshall L. A., 1959. Factors affecting sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **49**, 556
- Zentmyer G. A., Mircetich S. M., 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **56**, 710-712, ISSN: 0031-949X

ANEXOS

Anexo 1 – Caracterização física do solo

Quadro 1 – Dimensões das partículas do solo

Partículas	Dimensões (mm)
AG – Areia Grossa	2-0,2
AF – Areia Fina	0,2-0,02
L – Limo	0,02-0,002
A – Argila	0,002-0,0002

Fonte: Burges e Raw, 1967

Anexo 2 – Meios de cultura

2.1 Meio PDA (Potato Dextrose Agar)

Adicionar a 1L de água destilada, 39 g de PDA difco.

2.2 Meio de V8 (modificado de Erwin e Ribeiro, 1996)

Adicionar a cada 354 mL de sumo V8, 5 g de CaCO_3 . Levar o preparado a agitar, durante 20 minutos, a 4000 rpm.

Distribuir o sumo V8 com o CaCO_3 por tubos de Falcon, calibrá-los e centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos.

Diluir o sobrenadante numa proporção de 88 mL por 911 mL de água destilada.

Para o meio sólido, adicionar antes de autoclavar 15 g de agar por L de meio.

2.3 Meio PARPH (modificado de Jeffers e Martin, 1986)

Adicionar a 1L de água destilada, 17 g de cornmeal agar.

Após autoclavagem, adicionar os seguintes antibióticos:

- 5 mg de piramicina;
- 250 mg de ampicilina;
- 10 mg de rifampicina;

Adicionar também os seguintes fungicidas:

- 100 mg de PCNB;
- 25 mg de hymexazol.

2.4 Meio de agar-água (0,2%)

Adicionar a 1 L de água destilada, 2 g de agar.

Anexo 3 – Suspensão de solo (adaptado de Chee e Newhook, 1965; Tuset *et al.*, 2001)

Para 1 L de água destilada, adicionou-se 10 g de terra (descrita em 2.1). Agitar a mistura durante 2 horas e deixar a decantar durante a noite. Seguidamente, filtrar a suspensão 4 vezes por 4 camadas de papel de filtro com 150 mm de Ø (Whatman®) e armazenar no frio (9 °C).

Anexo 4 – Estados fenológicos (Escala BBCH)

Quadro 1 – Escala BBCH

Estado	Descrição
0	Germinação
1	Desenvolvimento foliar (caule principal)
2	Formação dos caules laterais / afilhamento
3	Elongação dos ramos ou crescimento da roseta / desenvolvimento do caule principal
4	Propagação vegetativa / “emborrachamento”
5	Emergência da inflorescência / florescimento
6	Florescimento
7	Desenvolvimento do fruto
8	Maturação do fruto ou semente
9	Senescência; início da dormência

Fonte: Hack *et al.*, 1992